

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192294** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.24

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.02.20

---

(54) **АНТИТЕЛА К TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/808,141

(32) 2019.02.20

(33) US

(86) PCT/US2020/019093

(87) WO 2020/172450 2020.08.27

(71) Заявитель:  
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Деннис Марк С., Данкэн Шери,  
Лизаинго Кэтлин, Монро Кэтрин М.,  
Парк Джошуа И., Пророк Рейчел,  
Ши Цзюй, Шривастава Анкита, Ван  
Ленгерих Беттина, Уолш Райли (US)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

---

(57) В одном аспекте представлены антитела, которые специфически связываются с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках 2 (TREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело снижает уровни растворимого TREM2 (sTREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает активность TREM2.

**A1**

**202192294**

**202192294**

**A1**

## АНТИТЕЛА К TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/808141, поданной 20 февраля, 2019, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Уровень техники

Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-2, (TREM2) представляет собой трансмембранный рецептор, который экспрессируется на микроглии и, как полагают, функционирует в регуляции фагоцитоза, выживаемости клеток и продукции провоспалительных цитокинов. Мутации в TREM2 были выявлены при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и лобно-височную деменцию. Кроме того, сообщалось об изменении уровня растворимого TREM2 (sTREM2) в спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера или лобно-височной деменцией, имеющих мутацию в TREM2.

Остается потребность в терапевтических агентах, которые модулируют активность TREM2 или уровни sTREM2.

Сущность изобретения

В одном аспекте представлены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках 2, (TREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2, содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность GFSIEDFYIH (SEQ ID NO:29);

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность W-I-D-P-E- $\beta_6$ -G- $\beta_8$ -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G (SEQ ID NO:47), где  $\beta_6$  представляет собой N или Q и  $\beta_8$  представляет собой D или E;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность HADHGNYGSTMDY (SEQ ID NO:31);

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность HASQHINWLS (SEQ ID NO:32);

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность KASNLHT (SEQ ID NO:33); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность QQGQTYPRТ (SEQ ID NO:34).

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-H2 выбрана из SEQ ID NO:30, 39, 41 и 43.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(b) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(c) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(d) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45 и 46. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах

осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:45.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:27, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:28; или

(b) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:35, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(c) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:37, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(d) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:38, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(e) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:40, и последовательность  $V_L$ ,

включающую SEQ ID NO:36; или

(f) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:42, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(g) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:44, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(h) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:45, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(i) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:46, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2, содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- $\alpha_6$ -F-Y-M-S (SEQ ID NO:48), где  $\alpha_6$  представляет собой D или N;

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- $\beta_5$ - $\beta_6$ -N- $\beta_8$ -Y-T- $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49), где  $\beta_5$  представляет собой K или R;  $\beta_6$  представляет собой A или P;  $\beta_8$  представляет собой G или A;  $\beta_{11}$  представляет собой A или T; и  $\beta_{12}$  представляет собой G или D;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность  $\gamma_1$ -R-L- $\gamma_4$ -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:50), где  $\gamma_1$  представляет собой A или T; и  $\gamma_4$  представляет собой T или S;

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- $\delta_{10}$ -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51), где  $\delta_{10}$  представляет собой N или T;

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность WMSTRAS (SEQ ID NO:8); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- $\phi_6$ -P-F-T (SEQ ID NO:52), где  $\phi_6$  представляет собой Y или F.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-H1 выбрана из любой из SEQ ID NO:4 и 12. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-H2 выбрана из любой из SEQ ID NO:5, 13 и 25. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-H3 выбрана из любой из SEQ ID NO:6, 14 и 17. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-L1 выбрана из любой из SEQ ID NO:7 и 23. В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR-L3 выбрана из любой из SEQ ID NO:9 и 18.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:



аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; или

(g) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, и 79. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:79. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:79. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:79.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 3, 11, 16, 20, 22, и 68. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:22. В некоторых

вариантах осуществления последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:15, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:16; или

(b) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:19 и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(c) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:21, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(d) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:19, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(e) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:79, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(f) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(g) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:26, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(h) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(i) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:26, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(j) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:2, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:3; или

(k) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:10, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:11; или

(l) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2, содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную

последовательность из любой из SEQ ID NO:4, 12 и 29;

(b) последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:5, 13, 25, 30, 39, 41 и 43;

(c) последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:6, 14, 17 и 31;

(d) последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:7, 23 и 32;

(e) последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:8 и 33; и

(f) последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:9, 18 и 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; или

(b) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; или

(c) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; или

(d) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую



включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(k) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает переменную область легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, 28, 36 и 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; или

(b) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:10, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:11; или

(c) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16; или

(d) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20; или

(e) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:21, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:20; или

(f) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по



последовательности SEQ ID NO:44, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:36; или

(s) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 45, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36; или

(t) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36; или

(u) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2, распознает эпитоп, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020306, клона CL0020188, клона CL0020188-1, клона CL0020188-2, клона CL0020188-3, клона CL0020188-4, клона CL0020188-5, клона CL0020188-6, клона CL0020188-7, клона CL0020188-8, клона CL0020307, клона CL0020123, клона CL0020123-1, клона CL0020123-2, клона CL0020123-3, клона CL0020123-4, клона CL0020123-5, клона CL0020123-6, клона CL0020123-7, и клона CL0020123-8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020123, клона CL0020123-1, клона CL0020123-2, клона CL0020123-3, клона CL0020123-4, клона CL0020123-5, клона CL0020123-6, клона CL0020123-7, и клона CL0020123-8. В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает один или более из следующих эпитопов в SEQ ID NO:1: (i) аминокислотные остатки 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)), (ii) аминокислоты 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) и (iii) аминокислотные остатки 126–129 (VEVL (SEQ ID NO:72)). В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с TREM2 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более из следующих эпитопов в SEQ ID NO:1: (i) аминокислотные остатки 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)), (ii) аминокислоты 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) и (iii) аминокислотные остатки 126–129 (VEVL

(SEQ ID NO:72)). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020188, клона CL0020188-1, клона CL0020188-2, клона CL0020188-3, клона CL0020188-4, клона CL0020188-5, клона CL0020188-6, клона CL0020188-7, клона CL0020188-8, клона CL0020307, и клона CL0020306. В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает аминокислотные остатки 143–149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69)) в SEQ ID NO:1. В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с TREM2 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков 143–149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69)) в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, снижает уровень растворимого белка TREM2 (sTREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, связывает растворимый белок TREM2 (sTREM2) в ЦСЖ здорового человека или ЦСЖ яванского макака с лучшей активностью по сравнению с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представлено комбинацией последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:73 и 74; SEQ ID NO:75 и 76; и SEQ ID NO:77 и 78. В некоторых вариантах осуществления анализ активности проводится в основном так, как описано в Примере 11. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, усиливает активность TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фагоцитоз или усиливает миграцию, дифференцировку, функцию или выживаемость миелоидных клеток, микроглии или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент улучшает функцию микроглии, не усиливая нейровоспаление. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фосфорилирование Syk. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фосфорилирование Syk в присутствии лиганда TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет перекрестную реактивность с белком TREM2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий

фрагмент, описанное в данном документе, представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, представляет собой полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе, представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv или двухвалентный scFv.

В еще одном аспекте в изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с выделенным антителом к TREM2, как описано в данном документе, за связывание с белком TREM2 человека.

В еще одном аспекте в изобретении представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, которое специфически связывается с TREM2, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте в изобретении представлены наборы, содержащие: антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, которое специфически связывается с TREM2, или фармацевтическая композиция, содержащая антитело к TREM2 или антигенсвязывающий фрагмент; и инструкции по их применению.

В еще одном аспекте в изобретении представлены способы лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту антитела к TREM2 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TREM2 или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильными зернами, бокового амиотрофического склероза, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельдта-Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной

деменции датского типа, болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена-Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу-Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна-Пика типа С, паллидо-понтонигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками.

В еще одном аспекте в изобретении представлены способы снижения уровня sTREM2 у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту антитела к TREM2 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TREM2 или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе.

В еще одном аспекте в изобретении представлены способы повышения активности TREM2 у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту антитела к TREM2 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TREM2 или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 включает репрезентативные гистограммы для проточной цитометрии, представляющие связывание иллюстративного антитела к TREM2 с поверхностью TREM2 на клетках НЕК, экспрессирующих TREM2.

Фиг. 2 включает репрезентативную кривую зависимости ответа в виде активации сигнала pSyk от дозы иллюстративного антитела к TREM2 в первичных макрофагах человека. Черные круги с заливкой (●) представляют антитело к TREM2, а белые круги без заливки (○) представляют изотипический контроль.

Фиг. 3А и 3В включают репрезентативные кривые зависимости ответа в виде активации сигнала pSyk от дозы в клетках образованной из ИПСК микроглии человека после предварительной обработки иллюстративными антителами к TREM2 в течение 5 минут (фиг. 3А) или в течение 24 часов (фиг. 3В), с последующим введением доз липидных везикул и оценкой ответа на липосомы в клетках.

На фиг. 4 представлены репрезентативные кривые доза-ответ для активности NFAT-зависимого репортерного гена люциферазы в клетках Jurkat NFAT, экспрессирующих TREM2/DAP12 человека в ответ на стимуляцию иллюстративными антителами к TREM2. Черные круги с заливкой (●) представляют антитело к TREM2, а белые круги без заливки (°) представляют изотипический контроль.

На фиг. 5 показаны репрезентативные кривые доза-ответ для выживаемости макрофагов человека в ответ на лечение иллюстративными антителами к TREM2.

На фиг. 6 показаны репрезентативные уровни растворимого TREM2 (sTREM2) в зависимости от концентрации антитела к TREM2 для иллюстративных антител к TREM2.

На фиг. 7 представлена гистограмма, демонстрирующая среднюю интенсивность флуоресценции pHrodo на клетку в макрофагах человека, обработанных иллюстративными антителами к TREM2.

На фиг. 8A представлены репрезентативное полученное с помощью микроскопа изображение накопления липидов в образованной из ИПСК микроглии, обработанной миелином, после инкубации с иллюстративным антителом к TREM2 или изотипическим контролем.

На фиг. 8B представлена репрезентативная гистограмма окрашивания нильским красным (указывающего на накопление липидов) образованной из ИПСК микроглии, которая была представлена на фиг. 8A.

Фиг. 8C-8F включают гистограммы, иллюстрирующие количественные уровни молекул холестерина эфира (фиг. 8C и 8E) и липидные молекулы триацилглицерида (фиг. 8D и 8F) в образованной из ИПСК микроглии, обработанной миелином, с последующей инкубацией с иллюстративными антителами к TREM2. На фиг. 8E и 8F представлены данные по образованной из ИПСК микроглии, для которой перед инкубацией с иллюстративными антителами к TREM2 был включен этап вымывания миелина.

Фиг. 9 включает репрезентативные фармакокинетические профили иллюстративных антител к TREM2 в плазме крови мыши.

Фиг. 10A и 10B включают гистограммы, иллюстрирующие изменение общего растворимого TREM2 (sTREM2) (фиг. 10A) и связанного с антителами TREM2 (фиг. 10B) в плазме крови мышей для иллюстративных антител к TREM2, которые вводили гомозиготным по KI мышам с кДНК TREM2 (*huTrem2<sup>KI/KI</sup>*).

Фиг. 11A и 11B включают кривые доза-ответ для связывания с TREM2 человека в клетках НЕК для иллюстративных гуманизированных и оптимизированных по последовательности антител к TREM2.

Фиг. 12А и 12В включают кривые зависимости ответа в виде активации сигнала pSyk от дозы иллюстративных гуманизированных и оптимизированных по последовательности антител к TREM2 в клетках HEK293-Н6.

На фиг. 13 показаны кривые доза-ответ для выживаемости макрофагов человека в ответ на лечение иллюстративными гуманизированными и оптимизированными по последовательности антителами к TREM2.

Фиг. 14А и 14В включают кривые доза-ответ для клиренса липидов в образованной из ИПСК микроглии в ответ на лечение иллюстративными гуманизированными и оптимизированными по последовательности антителами к TREM2.

Подробное описание сущности изобретения

## I. Введение

TREM2 представляет собой трансмембранный рецептор, который экспрессируется на поверхности микроглии, дендритных клеток, макрофагов и остеокластов. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, считается, что при связывании лиганда TREM2 образует сигнальный комплекс с трансмембранным адаптерным белком DNAX-активирующим белком 12 (DAP12), в котором, в свою очередь, фосфорилируется тирозин при помощи протеинкиназы SRC. Считается, что активированный сигнальный комплекс TREM2/DAP12 опосредует внутриклеточный сигналинг путем рекрутинга и фосфорилирования киназ, таких как Syk-киназа. Сигналинг TREM2/DAP12 модулирует такие виды деятельности, как фагоцитоз, рост и выживаемость клеток, секрецию провоспалительных цитокинов и миграцию таких клеток, как микроглия и макрофаги. TREM2 подвергается регулируемому внутримембранному протеолизу, при котором связанный с мембраной полноразмерный TREM2 расщепляется металлопротеазой ADAM10 на часть sTREM2, которая выводится из клетки, и удерживаемый мембраной C-концевой фрагмент, который далее деградирует под действием гамма-секретазы. Измененные уровни sTREM2 были зарегистрированы у пациентов с болезнью Альцгеймера или лобно-височной деменцией и мутацией в TREM2. Кроме того, мутации в TREM2 связаны с изменением функций, таких как нарушение фагоцитоза и снижение микроглиальной функции.

Как подробно описано в разделе «Примеры» ниже, были созданы антитела, которые специфически связываются с TREM2 человека и модулируют одну или более функций ниже сигнального комплекса TREM2/DAP12. Соответственно, в одном аспекте, в настоящем изобретении представлены антитела к TREM2 и их антигенсвязывающие фрагменты. Соответственно, в другом аспекте, в настоящем изобретении представлены антитела к TREM2 и их антигенсвязывающие части.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 усиливают активность TREM2, например, усиливают фагоцитоз или усиливают дифференциацию, функцию, миграцию или выживаемость миелоидных клеток, микроглии или макрофагов. Таким образом, в другом аспекте представлены способы повышения активности TREM2, например, у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 снижают shedding sTREM2. Таким образом, в другом аспекте представлены способы снижения уровня sTREM2, например, у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием.

## II. Определения

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

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно» при использовании для изменения количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают на то, что числовое значение, а также разумные отклонения от значения, известного специалисту в данной области техники, например,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$  или  $\pm 5\%$ , находятся в предполагаемом пределе приведенного значения.

В контексте данного документа термин «белок TREM2» относится к белку триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках 2, который кодируется геном *TREM2*. В контексте данного документа «белок TREM2» относится к нативному (т.е. дикого типа) белку TREM2 любого позвоночного животного, такого как человек, приматы, не относящиеся к человеку, (например, яванский макак), грызуны (например, мыши, крысы) и другие млекопитающие, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления белок TREM2 представляет собой белок TREM2 человека, имеющий последовательность, идентифицированную в UniprotKB под номером доступа Q9NZC2 (SEQ ID NO:1).

В контексте данного документа термин «антитело к TREM2» относится к антителу, которое специфически связывается с белком TREM2 (например, TREM2 человека).

Используемый в данном документе термин «антитело» относится к белку с укладкой цепи иммуноглобулинов, который специфически связывается с антигеном через его переменные области. Термин охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, одноцепочечные антитела, полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, моносспецифические антитела, моновалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие

антитела. В контексте данного документа термин «антитело» также включает фрагменты антител, которые сохраняют специфичность связывания через свои вариабельные области, включая, но не ограничиваясь этим, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv и двухвалентный scFv. Антитела могут содержать легкие цепи, которые классифицируются как каппа или лямбда. Антитела могут содержать тяжелые цепи, которые классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

Иллюстративная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины «вариабельная область легкой цепи» (VL) и «вариабельная область тяжелой цепи» (VH) относятся к этим легкой и тяжелой цепям, соответственно.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой цепи или легкой цепи антитела, который происходит от гена вариабельности (V), гена разнообразия (D) или гена присоединения (J) зародышевой линии (и не происходит из сегмента константного (C $\mu$  и C $\delta$ ) гена), и это придает антителу его специфичность связывания с антигеном. Обычно вариабельная область антитела включает четыре консервативные «каркасные» области, перемежающихся с тремя гипервариабельными «определяющими комплементарность областями».

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

«Каркасные области» или «FR» различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах одного вида. Каркасная область антитела, которая представляет собой комбинированные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для локализации и выравнивания CDR в трехмерном

пространстве. Каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов варибельной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных варибельных генов зародышевой линии «VBASE2» для последовательностей человека и мыши.

Аминокислотные последовательности CDR и каркасных областей могут быть определены с использованием различных хорошо известных определений в данной области техники, например, по Kabat, Chothia, международной базы данных ImMunoGeneTics (IMGT), AbM и наблюдаемых контактов антигенов («Contact»). В некоторых вариантах осуществления CDR определяются в соответствии с определением Contact. См., MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996). В некоторых вариантах осуществления CDR определяются комбинацией определений CDR Kabat, Chothia и/или Contact.

Термины «антигенсвязывающая часть» и «антигенсвязывающий фрагмент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, белок TREM2) через его варибельную область. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')<sub>2</sub> (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в области петли), одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидсвязанный Fv (dsFv), определяющие комплементарность области (CDR), VL (варибельную область легкой цепи) и VH (варибельную область тяжелой цепи).

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

Используемая в данном документе фраза «распознает эпитоп», как используется в отношении антитела к TREM2, означает, что CDR антитела взаимодействуют или

специфически связываются с антигеном (например, белок TREM2) в этом эпитопе или частью антигена, содержащей этот эпитоп.

В контексте данного документа термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит две или более различных антигенсвязывающих частей, в которых каждая антигенсвязывающая часть содержит отличную переменную область, которая распознает другой антиген, или фрагмент или часть антитела, которое связывается с двумя или более разными антигенами через свои переменные области. В контексте данного документа термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит две различных антигенсвязывающих частей, в которых каждая антигенсвязывающая часть содержит отличную переменную область, которая распознает другой антиген, или фрагмент или часть антитела, которое связывается с двумя разными антигенами через свои переменные области.

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

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

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

«Гуманизованное антитело» представляет собой химерный иммуноглобулин, полученный из не относящегося к человеку источника (например, мышинный), который содержит минимальные последовательности, полученные из не относящегося к человеку иммуноглобулина вне CDR. В общем, гуманизованное антитело будет содержать по меньшей мере один (например, два) антигенсвязывающий переменный домен(ы), в

котором области CDR по существу соответствуют областям иммуноглобулина не относящегося к человеку животного, а каркасные области по существу соответствуют областям последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, последовательность иммуноглобулина человека. Способы гуманизации антител известны в данной области техники.

«Человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее последовательности тяжелых и легких цепей человека, обычно происходящие из генов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления антитело продуцируется человеческой клеткой, животным, не являющимся человеком, которое использует репертуары человеческих антител (например, трансгенные мыши, которые генетически сконструированы для экспрессии последовательностей антитела человека), или платформами фагового дисплея.

Термин «специфически связывается» относится к молекуле (например, антителу или его антигенсвязывающей части), которая связывается с эпитопом или мишенью с большей аффинностью, большей авидностью и/или большей продолжительностью с этим эпитопом или мишенью в образце, чем она связывается с другим эпитопом или нецелевым соединением (например, структурно другим антигеном). В некоторых вариантах осуществления антитело (или его антигенсвязывающая часть), которое специфически связывается с эпитопом или мишенью, представляет собой антитело (или его антигенсвязывающую часть), которое связывается с эпитопом или мишенью с по меньшей мере в 5 раз большей аффинностью по сравнению с другими эпитопами или нецелевыми соединениями, например, с по меньшей мере в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или большей аффинностью. Термины «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «специфично для» конкретного эпитопа или мишени, используемые в данном документе, могут проявляться, например, в молекуле, имеющей равновесную константу диссоциации  $K_D$  для эпитопа или мишени, с которыми она связывается, например,  $10^{-4}$  М или меньше, например,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М или  $10^{-12}$  М. Специалисту будет понятно, что антитело, которое специфически связывается с мишенью (например, с белком TREM2) одного вида, может также специфически связываться с ортологами этой мишени (например, с белком TREM2).

Термин «аффинность связывания» используется в данном документе для обозначения силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном. Так, например, этот

термин может относиться к взаимодействию 1:1 между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном, если иное не указано или не ясно из контекста. Аффинность связывания может быть определена количественно путем измерения константы равновесной диссоциации ( $K_D$ ), которая относится к константе скорости диссоциации ( $k_d$ , время<sup>-1</sup>), разделенной на константу скорости ассоциации ( $k_a$ , время<sup>-1</sup> М<sup>-1</sup>).  $K_D$  можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплексов, например, с использованием способов поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например, системы Biacore™; анализов кинетического исключения, такие как KinExA®; и биослойной интерферометрии (например, с использованием платформы ForteBio® Octet). В контексте данного документа «аффинность связывания» включает не только формальные аффинности связывания, например, отражающее взаимодействие 1:1 между антителом (или его антигенсвязывающей частью) и антигеном, но и кажущиеся аффинности, для которых рассчитывают значения  $K_D$ , которые могут отражать авидное связывание.

Термин «вступать в перекрестную реакцию», в контексте данного документа, относится к способности антитела связываться с антигеном отличным от антигена, против которого было выработано антитело. В некоторых вариантах осуществления перекрестная специфичность относится к способности антитела связываться с антигеном другого вида, чем антиген, против которого было выработано антитело. В качестве неограничивающего примера, антитело к TREM2, как описано в данном документе, образованное в ответ на пептид TREM2 человека, может проявлять перекрестную реактивность с пептидом или белком TREM2 другого вида (например, обезьяны или мыши).

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

Термин «аминокислота» относится к аминокислотам природного и искусственного происхождения, а также к аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, которые функционируют подобно аминокислотам природного происхождения. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те, которые кодируются генетическим кодом,

а также те аминокислоты, которые позднее модифицируются, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Встречающиеся в природе  $\alpha$ -аминокислоты включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереизомеры встречающихся в природе  $\alpha$ -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser), D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации. «Аналоги аминокислот» представляют собой соединения, которые обладают сходной базовой химической структурой, как у аминокислот природного происхождения, т.е.  $\alpha$ -углерод, который связан с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа, например, гомосерин, норлейцин, метионина сульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют сходную базовую химическую структуру, как у аминокислот природного происхождения. «Аминокислотные имитаторы (миметики)» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует подобно природной аминокислоте. Аминокислоты могут называться в данном документе или своими общеизвестными трехбуквенными обозначениями, или однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Термины «полипептид» и «пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Термины применяются к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический имитатор соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающихся в природе аминокислотным полимерам и не встречающихся в природе полимерам аминокислот. Полимеры аминокислот могут включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

Термин «белок» в контексте данного документа относится либо к полипептиду, либо к димеру (т.е. двум), либо к мультимеру (т.е. трем или более) одноцепочечных

полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, например, дисульфидной связью или нековалентными взаимодействиями.

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

Термины «консервативная замена» и «консервативная мутация» относятся к изменению, которое приводит к замене аминокислоты на другую аминокислоту, которая может быть отнесена к категории обладающих аналогичным свойством. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определенных таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовую кислоту или E), Asp (аспарагиновую кислоту или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также можно выделить подгруппы. Например, группа заряженных или полярных аминокислот может быть подразделена на подгруппы, включая: «положительно заряженную подгруппу», включающую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», включающую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», включающую Asn и Gln. В другом примере ароматическая или циклическая группа может быть подразделена на подгруппы, включая: «подгруппу азотного кольца», включающую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», включающую Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическая группа может быть подразделена на подгруппы, например, «алифатическую неполярную подгруппу», включающую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», включающую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в подгруппах, указанных выше, таких как, но не ограничиваясь ими: Lys на Arg или наоборот, так что можно поддерживать положительный заряд; Glu вместо Asp или

наоборот, таким образом, чтобы можно было сохранить отрицательный заряд; Ser для Thr или наоборот, таким образом, чтобы можно было сохранить свободный -OH; и Gln для Asn или наоборот, таким образом, чтобы можно было сохранить свободный -NH<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты заменяют встречающуюся в природе гидрофобную аминокислоту, например, в активном сайте, чтобы сохранить гидрофобность.

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

Для сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна аминокислотная последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание может быть выполнено с использованием различных способов, доступных специалисту в данной области техники, например, визуального выравнивания или с использованием общедоступного программного обеспечения с использованием известных алгоритмов для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) или Megalign (DNASTAR). Параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания, могут быть определены специалистом в данной области техники. Для сравнения последовательностей полипептидных последовательностей для целей данной заявки используется стандартный белок BLAST алгоритма BLASTP для выравнивания двух последовательностей белков с параметрами по умолчанию.

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

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

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к неактивному фармацевтическому ингредиенту, который является биологически или фармакологически совместимым для применения у людей или животных, такому как буфер, носитель или консервант, но не ограничиваясь ими.

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

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

Термин «контроль» или «контрольное значение» относится к контрольному или исходному значению. Подходящий контроль может быть определен специалистом в данной области техники. В некоторых случаях контрольные значения могут быть определены относительно исходного уровня в рамках одного и того же субъекта или эксперимента, например, измерение sTREM2, произведенное до лечения антителом к TREM2, может быть контрольным значением для измерения уровня sTREM2 после лечения у того же субъекта. В других случаях контрольное значение может быть определено относительно контрольного субъекта (например, здорового контрольного субъекта или контроля заболевания) или среднего значения в популяции контрольных субъектов (например, здоровые контрольные субъекты или контроли заболевания, например, популяции 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 контрольных субъектов или более), например, измерение уровня sTREM2 субъекта либо на исходном уровне, либо после лечения можно сравнить со значением здорового контроля.

### III. Антитела к TREM2

В одном аспекте представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с белком TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 является селективным в отношении TREM2 по сравнению с другими TREM-подобными рецепторами (например, TREM1).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, содержащее одну или более последовательностей определяющей комплементарности области (CDR), вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит одну или более последовательностей CDR, вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как описано в данном документе, и дополнительно имеет одну или более функциональных характеристик, как описано в данном документе, например, антитело, которое усиливает активность TREM2 (например, усиливает фагоцитоз или усиливает миграцию, дифференциацию, функцию или выживаемость клетки, такой как миелоидная клетка, микроглия или макрофаг), или антитело, которое снижает уровень sTREM2.

### Последовательности антитела к TREM2

В некоторых вариантах осуществления анти-TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи или ее часть и/или

последовательность легкой цепи или ее часть, полученную из любого из следующих описанных в данном документе антител к TREM2: клона CL0020306, клона CL0020188, клона CL0020307 и клона CL0020123. Аминокислотные последовательности CDR, варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи этих клонов приведены в неофициальном перечне последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой гуманизированное антитело и/или антитело с созревшей аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) последовательности CDR1 тяжелой цепи (CDR-H1), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:4, 12 и 29, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:4, 12 и 29;

(b) последовательности CDR2 тяжелой цепи (CDR-H2), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:5, 13, 25, 30, 39, 41 и 43, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:5, 13, 25, 30, 39, 41 и 43;

(c) последовательности CDR3 тяжелой цепи (CDR-H3), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:6, 14, 17 и 31, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:6, 14, 17 и 31;

(d) последовательности CDR1 легкой цепи (CDR-L1), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:7, 23 и 32, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:7, 23 и 32;

(e) последовательности CDR2 легкой цепи (CDR-L2), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:8 и 33, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:8 и 33; и

(f) последовательности CDR3 легкой цепи (CDR-L3), имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO:9, 18 и 34, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:9, 18 и 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит два, три, четыре, пять или все шесть из (a)-(f). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит CDR-H1 из (a), CDR-H2 из (b) и CDR-H3 из (c). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит CDR-L1 из (d), CDR-L2 из (e) и CDR-L3 из (f). В некоторых вариантах осуществления CDR, имеющей до двух аминокислотных замен, имеет одну аминокислотную замену относительно эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления CDR, имеющей до двух аминокислотных замен, имеет две аминокислотные замены относительно эталонно последовательности. В некоторых вариантах осуществления до двух аминокислотных замен являются консервативными заменами.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит одну или более CDR, выбранных из группы, состоящей из:

(a) последовательности CDR-H1, включающей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 12 и 29;

(b) последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:5, 13, 25, 30, 39, 41 и 43;

(c) последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:6, 14, 17 и 31;

(d) последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:7, 23 и 32;

(e) последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:8 и 33; и

(f) последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:9, 18 и 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит два, три, четыре, пять или все шесть из (a)-(f). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит CDR-H1 из (a), CDR-H2 из (b) и CDR-H3 из (c). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит CDR-L1 из (d), CDR-L2 из (e) и CDR-L3 из (f).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую



включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(h) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(i) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(j) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79. В некоторых вариантах осуществления анти-TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, 28, 36 и 68. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NOS:3, 11, 16, 20, 22, 28, 36 и 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит: переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, 28, 36 и 68. В некоторых вариантах осуществления анти-TREM2 содержит: переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, 28, 36 и 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; или

(b) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:10, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:11; или

(c) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16; или

(d) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20; или

(e) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:21, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:20; или

(f) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22; или

(g) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 79, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22; или

(h) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности



(t) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36; или

(u) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит одну или более последовательностей, которые охватываются консенсусной последовательностью, описанной в данном документе. В качестве неограничивающего примера, консенсусные последовательности могут быть определены путем выравнивания последовательностей тяжелой или легкой цепи (например, CDR) для антител, которые происходят из одной и той же (или похожей) зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления консенсусные последовательности могут быть получены из антител, содержащих последовательности одинаковой (или похожей) длины и/или имеющих по меньшей мере один очень похожий CDR (например, очень похожий CDR3). В некоторых вариантах осуществления такие последовательности в этих антителах могут быть выровнены и подвергнуты сравнению для выявления консервативных аминокислот или мотивов (т.е., где изменение последовательностей может изменить функцию белка) и/или областей, где происходит изменение последовательностей (т.е., где изменение последовательности, скорее всего, не окажет существенного влияния на функцию белка). Альтернативно, консенсусные последовательности могут быть определены путем выравнивания последовательностей тяжелой или легкой цепи (например, CDR) для антител, которые связываются с одинаковыми или похожими (например, перекрывающимися) эпитопами для определения консервативных аминокислот или мотивов (т.е. где изменение последовательностей может изменить функцию белка) и областей, где возникают вариации при выравнивании последовательностей (т.е. где вариации последовательностей вряд ли существенно повлияют на функцию белка). В некоторых вариантах осуществления можно определить одну или более консенсусных последовательностей для антител, которые распознают тот же или подобный эпитоп, что и антитело к TREM2, как описано в данном документе. Иллюстративные консенсусные последовательности включают SEQ ID NO:47-52. В консенсусных последовательностях SEQ ID NO:47-52 заглавная буква обозначает аминокислотный остаток, который абсолютно консервативен среди выровненных последовательностей (например, выровненных последовательностей CDR), а «X» или греческая буква (например, « $\alpha$ », « $\beta$ », « $\gamma$ », « $\delta$ », « $\epsilon$ » или « $\phi$ ») обозначает аминокислотный остаток, который не является абсолютно консервативным среди

выровненных последовательностей. Следует понимать, что при выборе аминокислоты для вставки в положение, обозначенное буквой «X» или греческой буквой, в некоторых вариантах осуществления аминокислота выбирается из аминокислот, найденных в соответствующем положении в выровненных последовательностях.

Клон CL0020123 и варианты CL0020123

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность GFSIEDFYIH (SEQ ID NO:29);

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность W-I-D-P-E- $\beta_6$ -G- $\beta_8$ -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G (SEQ ID NO:47), где  $\beta_6$  представляет собой N или Q и  $\beta_8$  представляет собой D или E;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность HADHGNYGSTMDY (SEQ ID NO:31);

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность HASQHINWLS (SEQ ID NO:32);

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность KASNLHT (SEQ ID NO:33); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность QQGQTYPRT (SEQ ID NO:34).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H2, выбранную из SEQ ID NO:30, 39, 41 и 43.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45 и 46. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45 и 46.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:28 и 36. В некоторых вариантах

осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:28 и 36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:27, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:28. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 30 и 31, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:32, 33 и 34, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:28.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 30, 31, 32, 33 и 34, соответственно, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере

90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:42, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 43 и 31, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:42. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:32, 33 и 34, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 43, 31, 32, 33 и 34, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, последовательность CDR-L1, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 41 и 31, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:32, 33 и 34, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:29, 41, 31, 32, 33 и 34, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36).

Клоны CL0020188, CL0020306, CL0020307, и варианты CL0020188

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- $\beta_6$ -F-Y-M-S (SEQ ID NO:48), где  $\beta_6$  представляет собой D или N;

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- $\beta_5$ - $\beta_6$ -N- $\beta_8$ -Y-T- $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49), где  $\beta_5$  представляет собой K или R;  $\beta_6$  представляет собой A или P;  $\beta_8$  представляет собой G или A;  $\beta_{11}$  представляет собой A или T; и  $\beta_{12}$  представляет собой G или D;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность  $\gamma_1$ -R-L- $\gamma_4$ -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:50), где  $\gamma_1$  представляет собой A или T; и  $\gamma_4$  представляет собой T или S;

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- $\delta_{10}$ -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51), где  $\delta_{10}$  представляет собой N или T;

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность WMSTRAS (SEQ ID NO:8); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- $\phi_6$ -P-F-T (SEQ ID NO:52), где  $\phi_6$  представляет собой Y или F.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, выбранную из SEQ ID NO:4 и 12. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H2, выбранную из SEQ ID NO:5, 13 и 25. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO:6, 14 и 17. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-L1, выбранную из SEQ ID NO:7 и 23. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-L3, выбранную из SEQ ID NO:9 и 18.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет

по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26 и 79. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26 и 79.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22 и 68. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22 и 68.

Клон CL0020188 и варианты CL0020188

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления антитело к

TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5 и 17, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 8 и 18, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:16.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5, 17, 7, 8, и 18, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:17, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:79. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:79, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5 и 17, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:79. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:23, 8 и 18, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или

97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5, 17, 23, 8 и 18, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22. В некоторых

вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25 и 17, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:23, 8 и 18, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25, 17, 23, 8 и 18, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную

область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25 и 17, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 8 и 9, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25, 17, 7, 8 и 9, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68).

Клон CL0020306

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:4, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:2, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5 и 6, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей

мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 8 и 9, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, 8 и 9, соответственно, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3).

Клон CL0020307

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления антитело к

TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:10, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:11. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 13 и 14, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7, 8 и 9, соответственно, и которые имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, конкурирующее за связывание с антителом, описанным в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12, 13, 14, 7, 8 и 9, соответственно, или антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11).

#### Характеристики связывания антитела к TREM2

В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, связывается с TREM2, который экспрессируется на клетке (например, первичной клетке или линии клеток, эндогенно

экспрессирующей TREM2, такой как макрофаги человека, или первичной клетке или линии клеток, сконструированной для экспрессии TREM2, например, как описано в разделе «Примеры» ниже). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, как описано в данном документе, связывается с очищенным или рекомбинантным белком TREM2, его частью или химерным белком, содержащим TREM2 или его часть (например, Fc-слитый белок, содержащий TREM2, или Fc-слитый белок, содержащий эктодомен TREM2).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком TREM2 человека, проявляет перекрестную реактивность с одним или более белками TREM2 другого вида. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком TREM2 человека, проявляет перекрестную реактивность с белком TREM2 яванского макака («супо»). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком TREM2 человека, проявляет перекрестную реактивность с белком TREM2 мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 проявляет перекрестную реактивность с TREM2 человека, TREM2 яванского макака и TREM2 мыши.

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

### Эпитопы, распознаваемые антителами к TREM2

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 распознает эпитоп TREM2 человека, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, описанным в данном документе. В контексте данного документа термин «по существу такой же», используемый в отношении эпитопа, распознаваемого клоном антитела, описанным в данном документе, означает, что антитело к TREM2 распознает эпитоп, который идентичен, находится внутри или почти идентичен (например, имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности или имеет одну, две или три аминокислотные замены, например, консервативные замены, относительно) или имеет существенное перекрытие с эпитопом (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% перекрытия), распознаваемым клоном антитела, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 распознает эпитоп TREM2 человека, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из клона CL0020306, клона CL0020188, клона CL0020307, и клона CL0020123.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 связывается с TREM2 человека на эпитопе в стеблевой области TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 распознает эпитоп TREM2 человека, содержащий, находящийся или состоящий из остатков 129–172 или остатков 131–169 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 распознает эпитоп TREM2 человека, содержащий, находящийся или состоящий из остатков 129–148 SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 распознает эпитоп TREM2 человека, содержащий, находящийся или состоящий из аминокислотных остатков 143–149 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 является агонистом, который активирует сигналинг TREM2/DAP12 (например, путем индуцирования фосфорилирования киназы, такой как Syk) и связывается с TREM2 человека на эпитопе в стеблевой области TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 связывается с TREM2 человека на эпитопе в стеблевой области TREM2 и ингибирует расщепление TREM2 протеазой (например, ADAM17).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 связывается с TREM2 человека на эпитопе в вариабельном домене Ig (IgV) TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой агонист, который активирует сигналинг TREM2/DAP12 (например, путем индуцирования фосфорилирования киназы, такой как Syk) и связывается с TREM2 человека на эпитопе в домене IgV TREM2. В

некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 связывается с TREM2 человека на эпитопе, содержащем или состоящем из одного или более из следующего: (i) аминокислотные остатки 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)) из SEQ ID NO:1, (ii) аминокислоты 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) из SEQ ID NO:1, и (iii) аминокислотные остатки 126–129 (VEVL (SEQ ID NO:72)) из SEQ ID NO:1.

#### Функциональные характеристики антитела к TREM2

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 (например, антитело, имеющее одну или более последовательностей CDR, вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как раскрыто) функционирует в отношении одной или более активностей TREM2, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, которое модулирует уровни белка sTREM2 (например, уровни sTREM2, который слущивается с поверхности клетки во внеклеточный образец), модулирует рекрутинг или фосфорилирование киназы, которая взаимодействует с сигнальным комплексом TREM2/DAP12 (например, киназы Syk), и/или модулирует одну или более активностей ниже сигнального комплекса, таких как фагоцитоз, рост клеток, выживаемость клеток, дифференцировка клеток, секреция цитокинов или миграция клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2, как описано в данном документе, связывает растворимый белок TREM2 (sTREM2) в ЦСЖ здорового человека или ЦСЖ яванского макака с лучшей активностью по сравнению с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело представлено комбинацией последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO:73 и 74; SEQ ID NO:75 и 76; и SEQ ID NO:77 и 78. В некоторых вариантах осуществления анализ активности проводится в основном так, как описано в Примере 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает одну или более активностей TREM2 (например, описанных в данном документе), которые индуцируются лигандом. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой липидный лиганд. Примеры липидных лигандов TREM2 включают, но не ограничиваются ими, 1-пальмитоил-2-(5'-оксовалероил)-sn-глицеро-3-фосфохолин (POVPC), 2-арахидоноилглицерин (2-AG), 7-кетохолестерин (7-KC), 24(S)-гидроксихолестерин (24ОНС), 25(S)-гидроксихолестерин (25ОНС), 27-гидроксихолестерин (27ОНС), ацилкарнитин (АС), алкилацилглицерофосфохолин (РАФ),  $\alpha$ -галактозилцерамид (KRN7000), бис(моноацилглицеро)фосфат (ВМР), кардиолипин (СL), церамид, церамид-1-фосфат (С1Р), холестеринный эфир (СЕ), фосфат холестерина (СР), диацилглицерол 34:1 (DG 34:1), диацилглицерол 38:4 (DG 38:4), диацилглицерол-

пирофосфат (DGPP), дигидроцерамид (DhCer), дигидросфингомиелин (DhSM), эфир-фосфатидилхолин (PCe), свободный холестерин (FC), галактозилцерамид (GalCer), галактозилсфингозин (GalSo), ганглиозид GM1, ганглиозид GM3, глюкозилсфингозин (GlcSo), сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS), Kdo2-липид А (KLA), лактозилцерамид (LacCer), лизоалкилацилглицерофосфохолин (LPAF), лизофосфатидную кислоту (LPA), лизофосфатидилхолин (LPC), лизофосфатидилэтаноламин (LPE), лизофосфатидилглицерин (LPG), лизофосфатидинозитол (LPI), лизосфингомиелин (LSM), лизофосфатидилсерин (LPS), N-ацил-фосфатидилэтаноламин (NAPE), N-ацил-серин (NSer), окисленный фосфатидилхолин (oxPC), пальмитиновую кислоту-9-гидроксистеариновую кислоту (PAHSA), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилэтанол (PEtOH), фосфатидную кислоту (PA), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидинозитол (PI), фосфатидилсерин (PS), сфинганин, сфинганин-1-фосфат (Sa1P), сфингомиелин (SM), сфингозин, сфингозин-1-фосфат (So1P), и сульфатид.

#### Модуляция шеддинга sTREM2

В некоторых вариантах осуществления антитело к sTREM2 изменяет уровни белка sTREM2 в образце, например, уровни sTREM2, который слущивается с поверхности клетки во внеклеточный образец. В некоторых вариантах осуществления антитело к sTREM2 снижает уровни sTREM2.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 снижает уровни sTREM2, если количество sTREM2 в обработанном образце снижается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 снижает уровни sTREM2, если количество sTREM2 в обработанном образце снижается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой количество sTREM2 в необработанном образце (например, супернатанте из TREM2-экспрессирующей клетки, которая не была обработана антителом к TREM2, или образце от субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2) или образце, обработанном соответствующим антителом, не связывающим с TREM2.

В некоторых вариантах осуществления шеддинг sTREM2 измеряется с использованием образца, состоящего из жидкости, например, крови, плазмы, сыворотки, мочи или спинномозговой жидкости. В некоторых вариантах осуществления образец включает спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец

включает супернатант клеточных культур (например, супернатант первичных клеток или линий клеток, эндогенно экспрессирующих TREM2, таких как макрофаги человека, или первичных клеток или линий клеток, сконструированных для экспрессии TREM2, например, как описано в разделе «Примеры» ниже).

В некоторых вариантах осуществления уровень sTREM2 в образце измеряется с помощью иммуноферментного анализа. Иммуноанализы известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, иммуноферментные анализы (EIA), такие как иммуноанализ с ферментативным усилением (EMIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноферментный анализ на микрочастицах (MEIA), иммуногистохимию (ИГХ), иммуноцитохимию, иммуноанализ с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммуноанализ (РИА), иммунофлуоресценцию, хемилюминесцентный иммуноанализ (CL) и электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ЭХЛ). В некоторых вариантах осуществления уровни sTREM2 измеряют с помощью анализа на основе ИФА. В некоторых вариантах осуществления уровни sTREM2 измеряют с помощью анализа на основе ИФА, как описано в разделе «Примеры» ниже.

#### Модуляция рекрутирования или фосфорилирования киназы

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 вызывает фосфорилирование киназы, которая взаимодействует с сигнальным комплексом TREM2/DAP12 (например, но не ограничиваясь этим, Syk, ZAP70, PI3K, Erk, AKT или GSK3b). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 индуцирует фосфорилирование киназы, которая взаимодействует с сигнальным комплексом TREM2/DAP12, не блокируя связывание нативного лиганда TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает фосфорилирование киназы, которая взаимодействует с сигнальным комплексом TREM2/DAP12, которое индуцируется лигандом TREM2 (например, липидным лигандом). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 индуцирует или усиливает фосфорилирование Syk. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 индуцирует или усиливает фосфорилирование Syk, если уровень фосфорилирования Syk в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 индуцирует фосфорилирование Syk, если уровень фосфорилирования Syk в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным

значением. В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой уровень фосфорилирования Syk в необработанном образце (например, образец, включающий TREM2-экспрессирующую клетку, которая не была обработана антителом к TREM2, или образец от субъекта, который не был обработан антителом к TREM2), или образец, который был обработан лигандом TREM2, но не антителом к TREM2, или образец, обработанный соответствующим антителом, не связывающим с TREM2.

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

В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование измеряют с помощью образца, содержащего одну или более клеток, например, одну или более TREM2-экспрессирующих клеток (например, первичные клетки или линии клетки, эндогенно экспрессирующие TREM2, такие как макрофаги человека или полученная из ИПСК микроглия, или первичные клетки или линии клеток, сконструированные для экспрессии TREM2, например, как описано в разделе «Примеры» ниже). В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой жидкость, например, кровь, плазму, сыворотку, мочу или спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец включает ткань (например, легкое, мозг, почку, селезенку, нервную ткань или скелетную мышцу) или клетки из такой ткани. В некоторых вариантах осуществления образец включает эндогенную жидкость, ткань или клетки (например, от человека или отличного от человека субъекта).

#### Модуляция фагоцитоза

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает фагоцитоз дебриса мертвых клеток, дебриса тканей, бета-амилоидных частиц или чужеродного материала. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает фагоцитоз, не блокируя связывание нативного лиганда TREM2. В некоторых вариантах

осуществления антитело к TREM2 усиливает фагоцитоз, индуцированный лигандом TREM2 (например, липидным лигандом). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает фагоцитоз, если уровень фагоцитоза в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает фагоцитоз, если уровень фагоцитоза в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой уровень фагоцитоза в необработанном образце, образце, который был обработан лигандом TREM2, но не антителом к TREM2, или образце, обработанном соответствующим антителом, не связывающим TREM2.

В некоторых вариантах осуществления фагоцитоз измеряют с помощью анализа фагоцитоза с меченым субстратом. В данной области техники известны анализы фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления анализ фагоцитоза проводят на образце, содержащем клетки, эндогенно экспрессирующие TREM2, такие как человеческие макрофаги или микроглия. В некоторых вариантах осуществления анализ фагоцитоза проводят на образце, содержащем клетки, которые были сконструированы для экспрессии TREM2. В некоторых вариантах осуществления фагоцитоз измеряют с помощью анализа фагоцитоза макрофагами человека, как описано в разделе «Примеры» ниже.

#### Модуляция дифференциации, функции, миграции и выживаемости клеток

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 улучшает миграцию клеток, выживаемость клеток, функцию клеток или их дифференцировку клеток (например, для миелоидных клеток, макрофагов и микроглии, включая полученную из ИПСК микроглию, и ассоциированную с заболеванием микроглию). Ассоциированную с заболеванием микроглию, ассоциированную с заболеванием, и способы обнаружения ассоциированной с заболеванием микроглии описаны в публикации Keren-Shaul *et al.*, *Cell*, 2017, 169:1276-1290. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию одного или более типов клеток (например, миелоидных клеток, макрофагов или микроглии). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 повышает выживаемость одного или более типов клеток (например, миелоидных клеток, макрофагов или микроглии). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2

усиливает функцию одного или более типов клеток (например, миелоидных клеток, макрофагов или микроглии). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает дифференцировку одного или более типов клеток (например, миелоидных клеток, макрофагов или микроглии). В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию, выживаемость, функцию и/или дифференцировку миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию, выживаемость, функцию и/или дифференцировку макрофагов. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию, выживаемость, функцию и/или дифференцировку микроглии. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает активацию микроглии. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию, выживаемость, функцию и/или дифференцировку ассоциированной с заболеванием микроглии. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию клеток, выживаемость клеток, функцию клеток или дифференцировку клеток без блокирования связывания нативного лиганда TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию клеток, выживаемость клеток, функцию клеток или дифференцировку клеток, которая индуцируется лигандом TREM2 (например, липидным лигандом).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 улучшает миграцию клеток, выживаемость клеток, функцию клеток или дифференцировку клеток, если уровень активности (например, миграции, выживаемости, функции или дифференцировки) в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает миграцию клеток, выживаемость клеток, функцию клеток или дифференцировку клеток, если уровень активности (например, миграции, выживаемости, функции или дифференцировки) в образце, обработанном антителом к TREM2, увеличивается в по меньшей мере 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления контрольное значение представляет собой уровень активности (например, миграции, выживаемости, функции или дифференцировки) в необработанном образце (например, в образце, который не был обработан антителом к TREM2), в образце, который был обработан лигандом TREM2, но не антителом к TREM2, или в образце, обработанном соответствующим антителом, не связывающим TREM2.

В некоторых вариантах осуществления миграцию клеток измеряют с помощью анализа хемотаксиса. Анализы хемотаксиса известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления анализ миграции клеток (например, анализ хемотаксиса) проводят на образце, содержащем клетки, эндогенно экспрессирующие TREM2, например, макрофаги человека. В некоторых вариантах осуществления анализ миграции клеток (например, анализ хемотаксиса) проводят на образце, содержащем клетки, которые были сконструированы для экспрессии TREM2. В некоторых вариантах осуществления миграцию клеток измеряют с помощью анализа хемотаксиса макрофагов человека, как описано в разделе «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления выживаемость клеток измеряют с помощью анализа жизнеспособности клеток. Анализы жизнеспособности клеток известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления анализ выживаемости клеток (например, анализ жизнеспособности клеток) проводят на образце, содержащем клетки, эндогенно экспрессирующие TREM2, например, макрофаги человека. В некоторых вариантах осуществления анализ выживаемости клеток (например, анализ жизнеспособности клеток) проводят на образце, содержащем клетки, которые были сконструированы для экспрессии TREM2. В некоторых вариантах осуществления выживаемость клеток измеряют с помощью анализа жизнеспособности макрофагов человека, как описано в разделе «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления функция клетки измеряют с помощью функционального анализа, подходящего для данной клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления функцию макрофагов оценивают с помощью анализа фагоцитоза, например, как описано в разделе «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления дифференцировку клеток измеряют путем оценки способности клеток, эндогенно экспрессирующих TREM2, к дифференцировке. Например, в некоторых вариантах осуществления дифференцировку клеток измеряют путем оценки способности макрофагов дифференцироваться из моноцитов, например, как описано в разделе «Примеры» ниже.

В некоторых вариантах осуществления активацию микроглии измеряют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления активацию микроглии измеряют с помощью ПЭТ-визуализации TSPO. Методы ПЭТ-визуализации TSPO известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 улучшает функцию микроглии без усиления нейровоспаления. Уровень нейровоспаления может быть определен путем измерения уровней цитокинов (например, воспалительных цитокинов),

таких как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-1ra, ТФР- $\beta$ , ИЛ-15 или ИФН- $\gamma$ , но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления уровни цитокинов измеряют с помощью иммуноанализов, например, иммуноферментного анализа (EIA), иммуноанализа с ферментативным усилением (EMIA), твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноферментного анализа на микрочастицах (MEIA), иммуногистохимии (ИГХ), иммуноцитохимии, иммуноанализа с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммуноанализа (РИА), иммунофлуоресценции, хемилюминесцентного иммуноанализа (CL) или электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ЭХЛ).

#### IV. Получение антител

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

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

Антитела могут быть получены с использованием любого количества систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как гибридома, или система экспрессии клеток СНО. Многие такие системы широко доступны у коммерческих поставщиков. В

вариантах осуществления, в которых антитело содержит как области  $V_H$ , так и области  $V_L$ , области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть экспрессированы с использованием одного вектора, например, в дицистронной экспрессионной единице, или под контролем различных промоторов. В других вариантах осуществления области  $V_H$  и  $V_L$  могут экспрессироваться с помощью отдельных векторов. Область  $V_H$  или  $V_L$ , как описано в данном документе, может дополнительно содержать метионин на N-конце.

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

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

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

Перенос массива генов человеческого иммуноглобулина зародышевой линии у таких мышей-мутантов зародышевой линии приведет к выработке человеческих антител при заражении антигеном. В качестве другого примера, антитела человека могут быть получены методами на основе гибридомы, например, с использованием первичных В-клеток человека для генерации линий клеток, продуцирующих человеческие моноклональные антитела.

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

В некоторых вариантах осуществления генерируются фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, V<sub>H</sub>, или V<sub>HH</sub>). Были разработаны различные способы для получения фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител. Однако таковые фрагменты теперь могут быть получены непосредственно с использованием рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть получены непосредственно из клеток *E. coli* и химически соединяются с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub>. В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны для специалистов в данной области техники.

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

В некоторых вариантах осуществления представлены полиспецифические антитела, включающие антитело к TREM2 (или его антигенсвязывающий фрагмент), как описано в данном документе, например, биспецифическое антитело. Полиспецифические

антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере по отношению к двум разным сайтам. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) обладает специфичностью связывания в отношении TREM2 и специфичностью связывания по меньшей мере в отношении одного другого антигена. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) связывается с двумя различными эпитопами TREM2. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) способно индуцировать кластеризацию TREM2 на поверхности клетки. Иллюстративный способ измерения кластеризации рецепторов с помощью конфокальной FRET-микроскопии описан в работе Wallrabe *et al.*, *Biophys. J.*, 2003, 85:559-571. Способы получения полиспецифических антител (например, биспецифических антител) включают, но не ограничиваются этим, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелой и легкой цепей в клетке-хозяине, конструирование «выступ-во-впадину», внутримолекулярную тримеризацию и слияние фрагмента антитела с N-концом или C-концом другого антитела, например, с tandemными вариабельными доменами.

#### V. Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2, как описано в данном документе, получают с помощью рекомбинантных способов. Соответственно, в некоторых аспектах в изобретении представлены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител к TREM2, как описано в данном документе (например, любое одно или более из CDR, вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в данном документе); векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты; и клетки-хозяева, в которые введены нуклеиновые кислоты и которые используются для репликации кодирующих антитела нуклеиновых кислот и/или для экспрессии антител.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе (например, как описано в разделе выше, озаглавленном «Последовательности антител к TREM2»). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей (например, CDR, тяжелой цепи или легкой цепи), раскрытых в неофициальном перечне последовательностей ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности) с последовательностью (например, CDR, тяжелой цепи или легкой цепи), раскрытой в неофициальном перечне последовательностей ниже. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе полинуклеотид функционально связан с гетерологичной нуклеиновой кислотой, например, с гетерологичным промотором.

Подходящие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению, или их фрагменты, включают векторы клонирования и векторы экспрессии. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, предназначенной для использования, полезные векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь одну мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и любой другой вектор, но не ограничиваются ими.

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

В еще одном аспекте представлены способы получения антитела к TREM2, как

описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе (например, клетки-хозяина, экспрессирующей полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе), в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

#### VI. Терапевтические способы с использованием антител к TREM2

В еще одном аспекте представлены терапевтические способы с использованием антитела к TREM2, как описано в данном документе (например, антитела к TREM2, как описано в Разделе III выше). В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления представлены способы модуляции одной или более активностей TREM2 (например, у субъекта с нейродегенеративным заболеванием).

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из: болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильными зернами, бокового амиотрофического склероза, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельдта-Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена-Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу-Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна-Пика типа С, паллидо-понтонигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых

вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Насу-Хакола. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой лобно-височную деменцию. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с белком TREM2 человека, например, антитела к TREM2, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TREM2, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 (или антигенсвязывающая часть или фармацевтическая композиция), как описано в данном документе, используется для лечения нейродегенеративного заболевания, которое характеризуется мутацией в TREM2. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание, характеризующееся мутацией в TREM2, представляет собой болезнь Альцгеймера, например, болезнь Альцгеймера, которое характеризуется мутацией R47H в TREM2.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы модуляции одной или более активностей TREM2 у субъекта (например, у субъекта с нейродегенеративным заболеванием). В некоторых вариантах осуществления способ включает модуляцию уровней sTREM2; модуляцию рекрутинга или фосфорилирования киназы, взаимодействующей с сигнальным комплексом TREM2/DAP12 (например, киназы Syk); модуляцию фагоцитоза (например, фагоцитоза клеточного дебриса, бета-амилоидных частиц и т.д.); модуляцию миграции клеток (например, миграцию миелоидных клеток, макрофагов, микроглии и ассоциированной с заболеванием микроглии); и/или модуляцию дифференцировки клеток (например, для миелоидных клеток, макрофагов, микроглии и ассоциированной с заболеванием микроглии). В некоторых вариантах осуществления представлены способы усиления одной или более активностей TREM2 у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления представлены способы снижения уровня sTREM2 у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ модуляции одной или более активностей TREM2 у субъекта включает введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, которая специфически связывается с белком TREM2 человека, например, антитела к TREM2, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TREM2, как описано в данном документе.

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

В некоторых вариантах осуществления представлены способы уменьшения скопления бляшек у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту антитела или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает болезнью Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животную модель нейродегенеративного заболевания (например, мышиную модель 5XFAD или APP/PS1). В некоторых вариантах осуществления накопление бляшек измеряют путем визуализации амилоидных бляшек и/или визуализации Тау-белков, например, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В некоторых вариантах осуществления введение антитела к TREM2 снижает накопление бляшек на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% по сравнению с исходным значением (например, уровнем накопления бляшек у субъекта до введения антитела к TREM2).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве или дозе. Диапазон суточной дозы, который может быть использован составляет от около 0,01 мг/кг до около 500 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 200 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 100 мг/кг, или от около 10 мг/кг до около 50 мг/кг. Однако дозировки могут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая выбранный путь введения, состав композиции, реакцию пациента, степень тяжести патологического состояния, массу субъекта и мнение врача, назначающего препарат. Дозировка может быть увеличена или уменьшена с течением времени, как того требует отдельный пациент. В определенных случаях пациенту сначала вводят низкую дозу, которая затем увеличивается до эффективной дозировки, приемлемой для пациента. Определение эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Способ введения антитела к TREM2, как описано в данном документе, может быть пероральным, внутрибрюшинным, трансдермальным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутривенным, ингаляционным, местным, внутриочаговым, ректальным, внутрибронхиальным, назальным, трансмукозальным, кишечным, посредством введения в глаз или ухо или любым другим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят перорально, внутривенно или внутрибрюшинно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 (и, необязательно, другой терапевтический агент) вводят субъекту в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 дней или дольше.

#### VII. Фармацевтические композиции и наборы

В еще одном аспекте представлены фармацевтические композиции и наборы, содержащие антитело, которое специфически связывается с белком TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и наборы предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и наборы предназначены для применения в модуляции (например, усилении или ингибировании) одной или более активностей TREM2, например, фосфорилирования Syk. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и наборы предназначены для применения в модуляции (например, снижении) уровней sTREM2.

#### Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, описанное в Разделе III выше, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело к TREM2, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые не препятствуют или иным образом не препятствуют активности активного агента. Различные фармацевтически приемлемые эксципиенты хорошо известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, перорального, внутривнутрибрюшинного, интратекального, трансдермального, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или более физиологически приемлемых соединений, которые, например, стабилизируют композиции или увеличивают или уменьшают абсорбцию активного агента(-ов). Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, которые уменьшают клиренс или гидролиз

активных агентов, или вспомогательные вещества или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы хорошо известны в данной области.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть получены способом, который известен специалистам в данной области техники, например, посредством обычных способов смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации. Следующие способы и эксципиенты являются просто иллюстративными и никоим образом не ограничивают данное изобретение.

Для перорального введения антитело к TREM2 может быть составлено путем комбинирования его с фармацевтически приемлемыми носителями, которые хорошо известны в данной области техники. Такие носители позволяют получить соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, суспензионных смесей, суспензий и т.п. для перорального приема пациентом, который подлежит лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем смешивания соединений с твердым эксципиентом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения ядер таблеток или драже. Подходящие эксципиенты включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы и/или поливинилпирролидон (PVP). При желании могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

Антитело к TREM2 может быть составлено для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Для инъекции соединения или соединения могут быть составлены в препараты путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, если необходимо, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления соединения могут быть приготовлены в водных

растворах, например, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Составы для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в контейнерах с множеством доз, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать формулирующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 готовят для доставки в составе с медленным высвобождением, контролируемым высвобождением, пролонгированным высвобождением, замедленным высвобождением или отсроченным высвобождением, например, в полупроницаемых матрицах твердых гидрофобных полимеров, содержащих активный агент. Были созданы различные типы материалов с замедленным высвобождением, которые хорошо известны специалистам в данной области. Текущие составы с пролонгированным высвобождением включают таблетки с пленочным покрытием, системы из множества частиц или гранул, матричные технологии с использованием гидрофильных или липофильных материалов и таблетки на основе воска с порообразующими наполнителями. Системы доставки с замедленным высвобождением могут, в зависимости от их конструкции, высвобождать соединения в течение часов или дней, например, в течение 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 часов или более. Обычно составы с замедленным высвобождением могут быть получены с использованием природных или синтетических полимеров, например, полимерных винилпирролидонов, таких как поливинилпирролидон (ПВП); карбоксивинилгидрофильных полимеров; гидрофобных и/или гидрофильных гидроколлоидов, такие как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и гидроксипропилметилцеллюлоза; и карбоксиполиметилен.

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

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

## Наборы

В некоторых вариантах осуществления представлены наборы, содержащие антитело к TREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой антитело, описанное в Разделе III выше, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к TREM2, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, например, болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент для применения в лечении когнитивного или поведенческого симптома нейродегенеративного заболевания (например, антидепрессант, агонист дофамина или антипсихотик). В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой нейропротекторное средство (например, карбидопа/леводопа, антихолинергическое средство, дофаминергическое средство, ингибитор моноаминоксидазы В (МАО-В), ингибитор катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), глутаматергическое средство, ингибитор деацетилазы гистонов (HDAC), каннабиноид, ингибитор каспазы, мелатонин, противовоспалительное средство, гормон (например, эстроген или прогестерон) или витамин).

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к TREM, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более реагентов для измерения уровней sTREM2. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к TREM, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более реагентов для измерения активности TREM2 (например, для измерения фосфорилирования Syk).

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

CD-ROM) и тому подобное. Такие средства информации могут включать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие учебные материалы.

### VIII. Примеры

Настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью конкретных примеров. Следующие примеры ниже предлагаются только для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

#### Пример 1. Получение и первоначальная характеристика антитела к TREM2

Рекомбинантная экспрессия и очистка мышино-Fc-слитого ВКД человеческого TREM2

Эктодомен (остатки 19–172) TREM2 человека (UniProtKB ID – Q9NZC2) был субклонирован в вектор pRK с сигналом секреции V-III каппа-цепи IgG мыши, аминокислоты 1–20 (UniProtKB ID – P01661) в N-концевой области и мышиной Fc-меткой в C-концевой области с GGGGS (SEQ ID NO:64) между ВКД TREM2 и Fc.

Очищенную плазмиду трансфецировали в клетки Expi293F™ (Thermo Fisher) с помощью набора Expi293F™ Expression System Kit в соответствии с инструкциями производителя. Для ингибирования созревания N-связанных гликанов и снижения гетерогенности гликозилирования в культуру добавляли кифунензин (Sigma), ингибитор высшей маннозидазы I, в концентрации 1 мкг/мл сразу после трансфекции. Трансфецированные клетки инкубировали в орбитальном шейкере (Infors HT Multitron) при 125 об/мин и 37°C в увлажненной атмосфере с 6% CO<sub>2</sub>. Усилители трансфекции ExpiFectamine™ 293 1 и 2 были добавлены к клеткам через 16 часов после трансфекции, а супернатант среды был собран через 96 часов после трансфекции. К осветленному супернатанту добавляли ингибитор протеаз без ЭДТА (Roche) и хранили при -80°C.

Для выделения rhTREM2-Fc супернатант осветленной среды загружали на аффинную колонку HiTrap MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare Life Sciences) и промывали 200 mM аргинином и 137 mM сукцинатного буфера, pH 5,0. Слитый белок элюировали в 100 mM QB цитратного буфера при pH 3,0 и 50 mM NaCl. Сразу после элюирования к раствору белка добавляли 1M буфера Трис-HCl pH 8,0 для нейтрализации pH. Белковые агрегаты разделяли методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). Буфер подвижной фазы ЭХ поддерживали на уровне 20 mM Трис-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl и 50 mM аргинина, который также являлся буфером для хранения белка. Все стадии хроматографии проводили на системах АКТА pure или АКТА Avant (GE Healthcare Life Sciences).

#### Рекомбинантная экспрессия и очистка His-меченного ВКД TREM2

Эктодомен (остатки 19–172) TREM2 (UniProtKB - Q9NZC2) был субклонирован в

вектор pRK с сигналом секреции от мышинового V-III каппа-цепи Ig, аминокислоты 1–20 (UniProtKB ID - P01661) в N-концевой области, и меткой 6X-His (SEQ ID NO:65) в C-концевой области. Вставка была проверена с помощью секвенирования, и была проведена очистка плазмиды *taxi* *prer*.

Очищенную плазмиду трансфецировали в клетки Expi293F™ (Thermo Fisher) с помощью набора Expi293F™ Expression System Kit в соответствии с инструкциями производителя. Трансфецированные клетки инкубировали в орбитальном шейкере (Infors NT Multitron) при 125 об/мин и 37°C в увлажненной атмосфере с 6% CO<sub>2</sub>. Усилители трансфекции ExpiFectamine™ 293 1 и 2 были добавлены к клеткам через 16 часов после трансфекции, а супернатант среды был собран через 96 часов после трансфекции.

К собранной среде добавляли 1М имидазола pH 8,0 до конечной концентрации 10 мМ и фильтровали с помощью одноразовых фильтров Nalgene™ Rapid-Flow™ (Thermo Fisher) с размером пор 0,4 мкм. Смолу HisPur™ Ni-NTA (Thermo Fisher) промывали водой MQ и уравнивали нагрузочным буфером (20 мМ Трис pH 8,0, 150 мМ NaCl и 10 мМ имидазола). Аффинную очистку проводили с использованием гравитационного способа. Собранную среду загружали на смолу, а неспецифически связанные белки промывали нагрузочным буфером, дополненным 50 мМ и 100 мМ имидазола. Связанный His-меченый эодомен TREM2 элюировали 20 мМ Трис pH 8,0, 150 мМ NaCl и 200 мМ имидазола. Элюированный белок концентрировали с помощью концентраторов Amicon 10 кДа, а концентрированный белок дополнительно очищали методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием системы АКТА Avant (GE Healthcare Life Sciences). Белок загружали на колонку HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences), уравнишенную 1x PBS, элюировали и фракционировали, используя 1x PBS в качестве рабочего буфера. Элюированные фракции анализировали методом электрофореза на полиакриламидных (ПААГ) гелях в денатурирующих и нативных условиях. Элюированные фракции были дополнительно охарактеризованы при помощи аналитической эксклюзионной хроматографии и определением массы интактного белка. Результаты ПААГ и аналитической характеристики были использованы для объединения фракций сильно гликозилированных белков, которые были разделены на аликвоты и хранились при -80°C.

#### Получение антител

Грызунов (мышей и крыс) иммунизировали по стандартным протоколам иммуногеном rhTREM2-Fc или клетками BWZ, экспрессирующими полноразмерный рецептор Trem2. Титры измеряли на протяжении всей иммунизации с использованием сывороток, собранных в разные моменты времени. Выявление антигенспецифического

иммунного ответа проводили с помощью проточной цитометрии с использованием иммуногена rhTREM2-Fc и живых клеток BWZ, экспрессирующих полноразмерный TREM2. Критерии отбора антител-кандидатов включали получение антител грызунов и специфичность связывания с TREM2, определяемую с помощью проточной цитометрии. Антителосекретирующие клетки были выделены из иммунных тканей животных, включая селезенку, лимфатические узлы и костный мозг.

Суспензии одиночных клеток были проанализированы для определения связывающих свойств секретируемых антител. Антителосекретирующие клетки загружали в микрофлюидные устройства и выделяли в реакционных камерах нанолитрового объема, что позволяло обнаруживать секретируемые антитела с помощью анализа на основе флуоресцентной микроскопии и микроскопии методом светлого поля (см., например, патент США № 9188593). Были проведены анализы связывания, включающие обнаружение связывания антител с микрогранулами, покрытыми антигеном, обнаружение связывания растворимого флуоресцентно меченного антигена с антителами, иммобилизованными на гранулах, и обнаружение связывания антител с антигенами, экспрессируемыми на поверхности клеток. Экспрессируемые на поверхности клеток антигены включают как рекомбинантную форму, так и нативные формы антигенов, презентированные на поверхности клеток.

Анализ изображений использовали для идентификации камер, демонстрирующих положительные флуоресцентные сигналы, указывающие на присутствие одной клетки, продуцирующей антитела с желаемыми свойствами, а содержимое камер извлекали и лизировали в 384-луночных планшетах (см., например, патент США №. 10087408). Затем лизаты одиночных клеток подвергали ОТ-ПЦР для амплификации последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей. Полученные ампликоны затем секвенировали для определения последовательности кДНК парных переменных областей тяжелой и легкой цепей из отобранных одиночных клеток. Полученные последовательности проверяли вручную и анализировали для определения разнообразия последовательностей и соматической гипермутации. Последовательности отбирали для экспрессии на основе данных скрининга и разнообразия последовательностей. Экспрессированные антитела тестировали для подтверждения специфичности связывания антигена.

#### Первичный скрининг антитела к TREM2

Первичный скрининг антител проводили в клетках HEK 293, экспрессирующих TREM2, ИПСК дикого типа и ИПСК с нокаутом TREM2 следующим образом.

## 1. Скрининг на связывание TREM2 в TREM2-экспрессирующих клетках НЕК

Линия клеток НЕК 293, стабильно экспрессирующая TREM2/DAP12 человека, была создана путем трансфекции клеток вектором, экспрессирующим TREM2 и DAP12 человека дикого типа, и только DAP12, соответственно. Были отобраны стабильно экспрессирующие клоны, и экспрессия TREM2 на поверхности клеток была оценена с помощью проточной цитометрии. APC-конъюгированное крысиное античеловеческое/мышьеанное моноклональное антитело к TREM2 (R&D, кат. № MAB17291) использовали для выявления экспрессии поверхностного TREM2. Клон, демонстрирующий самый высокий уровень экспрессии TREM2 дикого типа, был отобран и назван «НЕК293-Н6». Клоны, стабильно экспрессирующие DAP12, были проанализированы с помощью вестерн-блоттинга, и отобранный клон был назван «НЕК293-DAP12#1».

НЕК 293, сверхэкспрессирующие TREM2 человека, (НЕК293-Н6) и НЕК 293, сверхэкспрессирующие GFP (B5), собирали с помощью 0,05% трипсина и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После инкубации клетки центрифугировали и дважды промывали в буфере для проточной цитометрии (PBS + 0,5% BSA). Смешанные клетки ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии с раствором человеческого TruStain FcX (Biolegend, кат. № 422302) при плотности  $10^6$ /мл на линию клеток. Смешанные линии клеток высевали по 200000 клеток на лунку в 96-луночный круглодонный планшет и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После инкубации клетки центрифугировали и инкубировали с антителами к TREM2 с титрованием дозы от 0 до 200 нМ в течение 45 минут на льду. После инкубации клетки центрифугировали и трижды промывали буфером для проточной цитометрии. Затем клетки инкубировали со вторичным антителом (аффинно очищенный конъюгированный с Alexa Fluor 647 фрагмент F(ab')<sub>2</sub> козьего антитела к IgG человека (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, кат. № 109-606-088, разведение 1:800) в течение 30 минут на льду. После инкубации клетки промывали буфером для проточной цитометрии три раза, ресуспендировали в 100 мкл буфера для проточной цитометрии и анализировали методом проточной цитометрии (BD FACSCanto II, Сан-Хосе, штат Калифорния), для чего получали 30000 событий для каждого образца. Среднюю интенсивность флуоресценции на клетки рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo и использовали для построения кривой связывания в зависимости от дозы.

На фиг. 1 показан репрезентативный результат для иллюстративного антитела, которое связывает рецептор TREM2 клеточной поверхности в клетках НЕК293-Н6.

Оценка активации TREM2-зависимого сигналинга pSyk

Активация TREM2-зависимого сигналинга pSyk измеряли в клетках макрофагов человека или в клетках HEK293-H6 с помощью коммерческого анализа AlphaLisa от Perkin-Elmer.

Для всех экспериментов с использованием липидных везикул, содержащих 70% DOPC и 30% POPS, липидные везикулы получения в течение двух недель после проведения экспериментов следующим образом: 7 мг DOPC (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) и 3 мг POPS (1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серин) объединяли в хлороформе в стеклянном флаконе и подвергали высушиванию под потоком газа N<sub>2</sub> в течение 1-2 часов или до полного высыхания. Липидную смесь повторно суспендировали в 1 мл HBSS (до конечной концентрации липидов около 10 мг/мл) и перемешивали вихревым способом в течение 2-3 минут. Затем липидную суспензию экструдировали с помощью мини-экструдера Avanti с одной мембраной с размером пор 100 нм для формирования небольших моноламеллярных везикул в концентрации 10 мг/мл.

#### 1. Обработка клеток антителами

За день до анализа макрофаги человека или клетки HEK293-H6 помещали на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, из расчета 100000 клеток/лунка или 40000 клеток/лунка. Антитела разводили в PBS, начиная с 300 нМ, и продолжали выполнять 10-точечные серийные разведения с 3-кратными разведениями между точками. Для построения кривых зависимости ответа от дозы антагониста в смесь антител/PBS также были включены липидные везикулы, содержащие 70% DOPC и 30% POPS в конечной концентрации 1 мг/мл. Клетки промывали 3 раза HBSS с использованием устройства для отмывки иммунологических планшетов Biotek 405/406, после чего добавляли 50 мкл на лунку раствора антитела/PBS (с везикулами или без них) с использованием устройства для манипуляций с жидкостями Hamilton Nimbus. Затем планшет с клетками переносили в инкубатор с температурой 37°C на 5 минут. Раствор липосомы/антител удаляли, переворачивая планшет, и добавляли 40 мкл буфера для лизиса (Cell Signaling Technologies, CST), содержащего 1 мкМ PMSF, с помощью устройства для манипуляций с жидкостями. Затем лизат либо замораживали при -80°C, либо сразу анализировали при помощи теста AlphaLisa.

Макрофаги человека были подготовлены для анализа следующим образом. Моноциты человека выделяли из свежей крови в соответствии с протоколом для коктейля для обогащения моноцитов человека RosetteSep (Stemcell Technologies, REF#15068). Выделенные моноциты промывали в промывочном буфере (PBS+2% FBS) и ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса ACK (ThermoFisher Scientific, кат. №

A10492) для лизиса эритроцитов. Для остановки лизиса клеток добавляли 20 (двадцать) мл промывочного буфера, образец центрифугировали и еще раз промывали культуральной средой (RPMI, 10% Hyclone FBS, 1% пирувата натрия, 1% глутамакса, 1% незаменимых аминокислот и 1% пенициллина/стрептомицина). Затем моноциты человека дифференцировали в макрофаги в культуральной среде в присутствии 50 нг/мл человеческого рекомбинантного М-КСФ (Gibco, кат. № PHC9501) в колбе объемом 250 мл. Свежий М-КСФ человека вводили на 3-й день, а макрофаги человека собирали на 5-й день и использовали для анализа.

## 2. Анализ AlphaLisa

Лизаты клеток анализировали на pSyk по стандартному протоколу набора Perkin Elmer pSyk AlphaLisa. Вкратце, 10 мкл лизата/лунка переносили в белую непрозрачную 384-луночный Optiplate (Perkin Elmer). Затем в каждую лунку добавляли 5 мкл Акцептор Mix (содержащей рабочий раствор акцепторных гранул), после чего планшеты запечатывали фольгой и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли 5 мкл Donor Mix (содержащего рабочий раствор донорских гранул) при пониженном освещении. Планшеты снова запечатывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Наконец, с использованием настроек AlphaLisa на планшетном ридере Perkin Elmer EnVision считывали планшеты.

На фиг. 2 показаны репрезентативные кривые зависимости ответа в виде активации сигнала pSyk от дозы антитела к TREM2 в первичных макрофагах человека. Черные круги с заливкой (●) представляют антитело к TREM2, а белые круги без заливки (○) представляют изотипический контроль. Каждая кривая представляет собой среднее значение трех независимых экспериментов, а значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 1 ниже. Результаты демонстрируют, что антитела к TREM2 способны активировать сигналинг TREM2-DAP12 ITAM в первичных макрофагах человека.

### Анализ ответа на липосомы в образованной из ИПСК микроглии

Агонистические антитела к TREM2 и фосфотидилсерин-содержащие липосомы активируют pSyk через TREM2. Чтобы понять влияние антител к TREM2 на сигналинг Syk в присутствии липосом, образованную из ИПСК микроглию предварительно обрабатывали антителом к TREM2, а затем оценивали ответ клеток на липосомы.

Перед анализом ИПСК сначала дифференцировали в гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) с помощью коммерчески доступного набора (STEMdiff Hematopoietic Kit от StemCell Technologies). HPC переносили в планшет, содержащий первичные астроциты человека, и совместно культивировали в течение 14–21 дня. Как только плавающие клетки в совместной культуре были преимущественно

идентифицированы как зрелую микроглию (>80%), микроглию использовали для анализа.

За два дня до анализа образованную из ИПСК микроглию человека помещали в количестве 30000 клеток/лунка в 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизинном. Антитела разводили до 100 нМ в среде, содержащей IMDM, 10% Hyclone FBS и 1% Pen-strep, и клетки подвергали воздействию раствора антител в течение 24 часов или 5 минут при 37°C. Затем клетки промывали один раз HBSS, а затем их подвергали воздействию липидных везикул, содержащих 70% DOPC и 30% POPS в концентрации 1 мг/мл в течение 5 минут при 37°C. Раствор липосом удаляли, переворачивая планшет, и добавляли 30 мкл буфера для лизиса (Cell Signaling Technologies, CST), содержащего 1 мкМ PMSF. Затем лизат либо замораживали при -80°C, либо сразу анализировали при помощи теста AlphaLisa. Лизаты клеток анализировали на pSyk по стандартному протоколу набора pSyk AlphaLisa от Perkin Elmer, как описано выше.

На фиг. 3А и 3В показана активация сигнала pSyk в образованной из ИПСК микроглии человека, инкубированной с антителами к TREM2, с последующим добавлением липидных везикул и оценкой ответа на липосомы в клетках. Белые столбцы демонстрируют инкубацию с PBS вместо липидных везикул в качестве контроля. Данные представляют собой среднее значение и стандартную ошибку для 2-7 независимых экспериментов. На фиг. 3А показаны данные для образованной из ИПСК микроглии, предварительно обработанной антителом в течение 5 минут, а на фиг. 3В показаны данные для образованной из ИПСК микроглии, предварительно обработанной антителом в течение 24 часов. Результаты демонстрируют, что предварительная обработка образованной из ИПСК микроглии человека антителами к TREM2 приводит к увеличению сигнала фосфо-Syk, вызванного липосомами, по сравнению с изотипическим контролем, что указывает на то, что антитела к TREM2 не мешают, а наоборот, усиливают липидную активацию сигналинга pSyk в клетках.

#### Анализ NFAT-зависимого репортерного гена TREM2 человека

Линии клеток Jurkat NFAT, экспрессирующие TREM2/DAP12 человека, получали следующим образом. Репортерные клетки Jurkat NFAT инфицировали лентивирусным вектором, экспрессирующим TREM2 и DAP12 человека, и культивировали в RPMI, содержащей 10% Hyclone FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Стабильно экспрессирующие клоны отбирали в присутствии пурамицина и зеоцина. Экспрессию TREM2 на поверхности клеток оценивали с помощью проточного цитометра, используя биотинилированное антитело к TREM2 (SEQ ID NOS:66 и 67). Клон, который демонстрировал самый высокий уровень экспрессии TREM2 дикого типа, был выбран и назван репортерными клетками hTrem2/NFAT Jurkat для анализа, описанного ниже.

За день до анализа 96-луночные планшеты предварительно покрывали антителом к TREM2 или изотипическим контролем при подборе дозы 0-500 нМ (45 мкл/лунка, всего 12 точек) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После ночной инкубации предварительно покрытые планшеты дважды промывали PBS, а затем добавляли репортерные клетки hTrem2/NFAT Jurkat ( $10^6$  клеток/лунка) в 200 мкл свежей культуральной среды (RPMI с 10% Hyclone FBS и 1% пенициллина/стрептомицина). Планшет инкубировали при 37°C в течение 24 часов, после чего в каждую лунку добавляли по 50 мкл/лунку раствора Quantlucia и хорошо перемешивали. Для анализа из каждой лунки отбирали 20 мкл раствора и переносили в 384-луночный белый планшет для измерения сигнала люминометром (Perkin Elmer Envision).

Фиг. 4 включает репрезентативные кривые зависимости ответа в виде активации NFAT от дозы антитела к TREM2, как измерено путем обнаружения репортерного гена люциферазы, а значения  $EC_{50}$  в отношении активации представлены в таблице 1 ниже. Результаты, представленные на фиг. 4 демонстрируют, что по сравнению с изотипическим контролем, антитела-кандидаты к TREM2 способны индуцировать активацию NFAT и достаточное количество нисходящих сигналов для активации транскрипционного ответа.

#### Анализ выживаемости макрофагов человека

Моноциты человека были выделены в соответствии с протоколом для коктейля для обогащения моноцитов человека RosetteSep (Stemcell Technologies, кат. № 15068). Выделенные моноциты промывали в промывочном буфере (PBS+2% FBS) и ресуспендировали в 10 мл раствора для лизиса ACK (ThermoFisher Scientific, кат. № A10492) для лизиса эритроцитов. Для остановки лизиса добавляли 20 (двадцать) мл промывочного буфера. Суспензию клеток центрифугировали и промывали один раз культуральной средой (RPMI 1640 + 10% FBS + пенициллин/стрептомицин). Клетки ресуспендировали в культуральной среде при плотности  $10^6$  клеток мкл/мл и использовали в описанном ниже анализе выживаемости.

За день до анализа 96-луночные планшеты были предварительно покрыты антителом к TREM2 или изотипическим контролем при подборе дозы 0-200 нМ (45 мкл/лунка, всего 12 точек) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После ночной инкубации предварительно покрытые планшеты дважды промывали PBS, а затем добавляли моноциты человека ( $10^5$  клеток/лунка) в присутствии низкой концентрации человеческого М-КСФ (5 нг/мл, Gibco, кат. № PHC9501). Через 5 дней при 37°C среду аспирировали, и 100 мкл PBS + 100 мкл среды Celltiter-glo (Promega, кат. № G7571) добавляли в каждую лунку. После 10 минут инкубации среде для клеток переносили в многолуночные планшеты, совместимые с люминометром, и регистрировали

люминесценцию для определения жизнеспособности клеток.

На фиг. 5 показаны репрезентативные кривые зависимости ответа в виде выживаемости макрофагов человека от дозы антитела к TREM2 в условиях низкого содержания М-КСФ, а значения  $EC_{50}$  для выживаемости приведены в таблице 1 ниже. Результаты демонстрируют, что агонистические антитела к TREM2 обладают достаточной способностью активации рецептора, чтобы вызвать транскрипционный ответ для модуляции клеточной функции и содействия выживаемости макрофагов человека в условиях низкого содержания М-КСФ.

#### Определение кинетики антител с помощью Biacore

Поверхностный плазмонный резонанс (прибор Biacore™ 8K) использовали для измерения аффинности антител к TREM2 в отношении ВКД TREM2 человека и яванского макака. Антитела к TREM2 захватывали с помощью набора Human Fab Capture Kit (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 28958325) на сенсорном чипе Biacore Series S CM5 (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 29149604). Последовательные 3-кратные разведения рекомбинантного TREM2 человека или яванского макака вводили со скоростью потока 30 мкл/мин. Связывание антител контролировали в течение 300 секунд, затем в течение 600+ секунд проводили мониторинг диссоциации антител в буфере HBS-EP+ (GE Healthcare Life Sciences, кат. № BR100669). Ответ на связывание корректировали путем вычитания значения RU из пустой проточной кюветы. Для анализа кинетики использовалась модель Лангира 1:1 одновременного подбора  $k_{on}$  и  $k_{off}$ . Значения связывания в виде  $K_D$  приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Характеристики антител *in vitro*

Антитело	hTREM2 в Biacore, $K_D$ (нМ)	TREM2 яванского макака в Biacore, $K_D$ (нМ)	Активация pSyk (макрофаги человека) $EC_{50}$ (нМ)	Активация pSyk (НЕК293-Н6) $EC_{50}$ (нМ)	Связывание клеток (человеческие макрофаги) $EC_{50}$ (нМ)	NFAT $EC_{50}$ (нМ)* *Покрытый мкАт планшет	Выживаемость $EC_{50}$ (нМ)* *Покрытый мкАт планшет
CL0020123	0,068	5,7	$7 \pm 2,7$		0,3	Не рассчитано	$44,7 \pm 30,3$
CL0020188	5,2	2,0	$7,7 \pm 1,5$		0,5	$91,2 \pm 47,0$	$2,4 \pm 1,3$

Н/С: связывание не обнаружено

Н/О: не определено

Пример 2. Модуляция уровней растворимого TREM2 и фагоцитоза в макрофагах человека

Анализ зависимости доза-ответ для растворимого TREM2 в макрофагах человека

Макрофаги человека были получены, как описано выше. За день до проведения анализа макрофаги человека помещали в 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином, в количестве 100000 клеток на лунку. Антитела разводили в среде для

макрофагов человека (RPMI, 10% Hyclone FBS, 1% пирувата натрия, 1% Glutamax, 1% заменимых аминокислот и 1% пенициллина/стрептомицина), начиная с 300 нМ и далее в 10-точечных серийных разведениях с 3-кратными разведениями между точками. Клетки подвергали воздействию антитела и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации с антителами планшет центрифугировали, чтобы удалить дебрис, и собирали супернатанты для измерения растворимого TREM2.

Растворимый TREM2 измеряли следующим образом. Вкратце, покрытые стрептавидином планшеты MSD с малыми пятнами (Meso Scale Discovery) покрывали биотинилированным поликлональным антителом к hTREM2 (R&D Systems) в течение ночи при 4°C. Затем планшеты блокировали 3% BSA/TBST в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы и стандарты готовили путем нагревания до 95°C в течение 5 минут в буфере, содержащем ДСН. Подготовленные образцы и стандарты разводили 1:10 в 3% BSA/TBST в аналитическом планшете для анализа после блокирования. Белок TREM2-His, разведенный в 3% BSA/TBST, использовали в качестве стандарта для абсолютного количественного определения. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре планшеты промывали в TBST. Первичное детектирующее антитело, сульф-меченное козье античеловеческое TREM2 (R&D Systems), разводили в 3% BSA/TBST, добавляли в планшеты и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. После промывки TBST планшеты MSD проявляли с использованием 2х буфера для считывания T от MSD, после чего была проведена детекция с помощью планшетного ридера MSD Sector. Значения MSD пересчитывали в абсолютное количество sTREM2 путем аппроксимации стандартной кривой с помощью программного обеспечения Prism 7.0 (Graphpad). Модуляция шеддинга TREM2 была представлена как отношение растворимого TREM2 из клеток, инкубированных с тестируемыми антителами к TREM2, к растворимому TREM2 из клеток, культивируемых без специфического антитела к TREM2 в среде.

На фиг. 6 показаны репрезентативные уровни растворимого TREM2 (sTREM2) в зависимости от концентрации антитела к TREM2. Результаты демонстрируют, что антитела к TREM2 способны снижать уровни sTREM2 в макрофагах человека дозозависимым образом после обработки в течение ночи.

#### Анализ фагоцитоза в макрофагах человека

Макрофаги человека были получены, как описано выше. За два дня до анализа макрофаги человека высевали в количестве 80000 клеток на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином. Антитела разводили в концентрации 100 нМ в среде, содержащей RPMI, 10% Hyclone FBS, 1% пирувата натрия, 1% глутамакса, 1% заменимых

аминокислот и 1% пенициллина/стрептомицина. Затем клетки подвергали воздействию раствора антител в течение 24 часов при 37°C. Затем клеточные ядра и клеточную мембрану окрашивали в течение 10 минут, после чего добавляли pHrodo-миелин в концентрации 5 мкг/мл. Затем клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Флуоресценцию pHrodo измеряли для каждой клетки на конфокальном микроскопе для одновременного многопараметрического анализа (Opera Phoenix), а интенсивность флуоресценции количественно оценивали при помощи программного обеспечения прибора.

pHrodo-миелин был получен путем очистки миелина из мозга мышей дикого типа линии C57Bl/6 (Jackson Laboratories) с использованием способов, описанных в публикации Safaiyan *et al.* (2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998). После очистки миелин был ресуспендирован в PBS и доведен до концентрации 1 мг белка /мл с помощью набора DC Protein Assay Kit 2 (BioRad, кат. № 5000112). Миелин был помечен pHrodo-Red с помощью набора Microscale Protein Labeling (ThermoFisher, кат. № P35363) в соответствии с инструкциями производителя. Избыток метки удаляли путем гранулирования миелина при 10000 g в течение 5 мин, удаления супернатанта и повторения этих шагов 3-5 раз.

На фиг. 7 показаны репрезентативные результаты анализа фагоцитоза в макрофагах человека. Фагоцитоз миелина определяли путем обнаружения и количественной оценки флуоресценции pHrodo на полученных с помощью микроскопа изображениях макрофагов, обработанных TREM2, и сравнения измеренных значений с изотипическим контролем. Результаты демонстрируют, что человеческие макрофаги, обработанные иллюстративными агонистическими антителами к TREM2, увеличивают фагоцитоз pHrodo-миелина по сравнению с изотипическим контролем, что указывает на то, что антитела к TREM2 могут способствовать благоприятному клиренсу миелинового дебриса в клетках.

### Пример 3. Модуляция накопления липидов в образованной из ИПСК микроглии

#### Анализ накопления липидов

Перед анализом ИПСК сначала дифференцировали в гемопоэтические клетки-предшественники (НРС) с помощью коммерчески доступного набора (STEMdiff Nematopoietic Kit от StemCell Technologies). НРС переносили в планшет, содержащий первичные астроциты человека, и совместно культивировали в течение 14–21 дня. Как только плавающие клетки в совместной культуре были преимущественно идентифицированы как зрелую микроглию (>80%), микроглию использовали для анализа.

Клетки (образованная из ИПСК микроглия, 30000 клеток/лунка) высевали в

покрытые PDL 96-луночные планшеты с полной сывороточной средой. Через 24 часа при 37°C очищенный немеченый миелин (конечная концентрация 50 мкг/мл, очищен из мозга мышей дикого типа линии C57Bl/6 (Jackson Laboratories) по способам, описанным в Safaiyan *et al.* (2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998)), вносили в лунки. Через 24 часа после обработки липидами при 37°C в лунки вносили антитело к TREM2 или контроль RSV в конечной концентрации 100 нМ. Клетки инкубировали еще 48-72 часа при 37°C перед сбором или визуализацией клеток. Для экспериментов по вымыванию миелина миелин удаляли после 24-часового периода инкубации и заменяли средой, содержащей антитела, для последующих 24-48 часов инкубации.

Для визуализации с помощью Nile Red супернатант удаляли, а клетки инкубировали при 37°C в течение 30 минут в буфере для визуализации живых клеток (Life Technologies, кат. № A14291DJ), содержащем 1 мкМ нильского красного (ThermoFisher, кат. № N1142) и 1 капля/мл Nucblue (ThermoFisher, кат. № R37605). После периода инкубации окрашивающий раствор удаляли, а клетки фиксировали в 4% параформальдегиде. Затем клетки были визуализированы с использованием настроек освещения Alexa 568 и DAPI на конфокальном сканере для одновременного многопараметрического анализа Opera Phoenix. Липидные пятна анализировали с помощью алгоритма поиска пятен в программном обеспечении Harmony, поставляемом с прибором. Фиг. 8А включает репрезентативное полученное с помощью микроскопа изображение образованной ИПСК микроглии, обработанной либо носителем, либо миелином (конечная концентрация 50 мкг/мл) в течение 24 часов, с последующей инкубацией с изотипическим контролем или иллюстративным антителом к TREM2 (CL0020123) в течение 72 часов. На фиг. 8В представлена репрезентативная гистограмма для того же антитела к TREM2, приведенное на полученном с помощью микроскопии изображении на фиг. 8А. Количественную оценку окрашивания нильским красным проводили по общей яркости пятен на клетку, и данные представляли как среднее и стандартное отклонение трех технических реплик в разных полях одного и того же образца микроскопии.

Для проведения анализа липидов клетки однократно промывали PBS и держали на льду. К клеткам в 96-луночном планшете добавляли 70 мкл раствора метанол:вода 9:1, содержащего внутренние стандарты 1:100. Планшет встряхивали на шейкере при 4°C и 1200 об/мин в течение 20 минут, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 300 x g. Образец супернатанта объемом 50 мкл переносили в пробирки для ЖХ/МС и хранили при -80°C до анализа на приборе.

Уровень липидов анализировали с помощью жидкостной хроматографии (система

Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Колумбия, штат Мэриленд, США), соединенной с масс-спектрометрией с электрораспылением (QTRAP 6500+, Sciex, Фрамингем, штат Массачусетс, США). Для каждого анализа 5 мкл образца вводили на колонку ВЕН С18 1,7 мкм, 2,1×100 мм (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс, США) со скоростью потока 0,25 мл/мин при 55°C. Для режима положительной ионизации подвижная фаза А состояла из 60:40 ацетонитрила/воды (об/об) с 10 мМ формиата аммония + 0,1% муравьиной кислоты; подвижная фаза В состояла из 90:10 изопропилового спирта/ацетонитрила (об/об) с 10 мМ формиата аммония + 0,1% муравьиной кислоты. Для режима отрицательной ионизации подвижная фаза А состояла из 60:40 ацетонитрила/воды (об/об) с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В состояла из 90:10 изопропилового спирта/ацетонитрила (об/об) с 10 мМ ацетата аммония. Градиент был запрограммирован следующим образом: 0,0-8,0 мин от 45% В до 99% В, 8,0-9,0 мин при 99% В, 9,0-9,1 мин до 45% В и 9,1-10,0 мин при 45% В. Электрораспылительную ионизацию проводили в режиме положительных или отрицательных ионов с использованием следующих настроек: «газовая завеса» на 30; «столкновительный газ» установлен на средний уровень; напряжение ионного распыления – 5500 (режим положительных ионов) или 4500 (режим отрицательных ионов); температура 250°C (режим положительных ионов) или 600°C (режим отрицательных ионов); газ источника ионов 1 – 50; газ источника ионов 2 – 60. Сбор данных осуществляли с помощью программы Analyst 1.6.3 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) со следующими параметрами: минимальное время измерения (мсек) и энергия соударений (СЕ); потенциал декластеризации (DP) – 80; входной потенциал (EP) – 10 (режим положительных ионов) или -10 (режим отрицательных ионов), и напряжение на выходе ячейки соударений (СХР) – 12,5 (режим положительных ионов) или -12,5 (режим отрицательных ионов). Количественное определение липидов проводили с использованием смеси неэндогенных внутренних стандартов. Липиды были идентифицированы на основе их времени удерживания и MRM свойств коммерчески доступных эталонных стандартов (Avanti Polar Lipids, Бирмингем, штат Алабама, США).

На фиг. 8С и 8D показаны уровни молекул холестерина эфира (СЕ) (фиг. 8С) и липидных молекул триацилглицеридов (TAG) (фиг. 8D), обнаруженные с помощью масс-спектрометрии в лизатах образованных из ИПСК клеток микроглии, обработанных иллюстративными антителами к TREM2 в течение 72 часов после 24-часовой обработки миелином. На фиг. 8Е и 8F показаны уровни холестерина эфира (СЕ) (фиг. 8Е) и липидных молекул триацилглицеридов (TAG) (фиг. 8F), обнаруженные с помощью масс-спектрометрии в лизатах образованных из ИПСК клеток микроглии, которые подверглись

экспериментам по вымыванию миелина с использованием иллюстративных антител к TREM2. Данные ЖХ/МС, приведенные на фиг. 8С-8F были нормализованы к внутренним стандартам для данных СЕ и нормализованы к миелину + изотипическому контролю для каждой отдельной липидной молекулы для данных TAG.

Накопление липидов в образованной из ИПСК микроглии индуцируется обработкой миелином, что отражается в увеличении окрашивания нейтральных липидов (нильский красный) и с помощью ЖХ/МС для обнаружения специфических липидных молекул в клеточных лизатах. Данные, приведенные на фиг. 8А-8F в совокупности демонстрируют, что обработка образованных из ИПСК клеток микроглии после стимуляции миелином с иллюстративными антителами к TREM2 снижает накопление липидов, о чем свидетельствует снижение окрашивания нейтральных липидов в клетках и снижение уровней липидов СЕ и TAG, измеренных методом ЖХ/МС. Снижение уровня липидов в результате обработки антителами наблюдали в различные временные точки, от 24 часов до 72 часов. Чтобы исключить возможность того, что снижение уровня липидов вызвано блокированием поглощения липидов, были проведены эксперименты по вымыванию миелина, в которых миелин удаляли до добавления антитела к TREM2. На фиг. 8F показано, что антитела к TREM2 также снижали уровень липидов в образованной из ИПСК микроглии с вымыванием миелина до обработки антителами относительно изотипического контроля.

#### Пример 4. Сортировка антител по функциональным эпитопам

Группы эпитопов антитела к TREM2 были определены путем конкурентного связывания с белком TREM2. Эксперимент с эпитоп-специфической сортировкой проводили на приборе Carterra LSA с использованием эпитоп-специфической сортировки на основе классического сэндвич-метода при 25°C. Все тестируемые антитела были иммобилизованы на чипе HC30M путем сочетания с аминокислотной группой. Затем были проведены многократные циклы конкурентного сэндвич-анализа связывания для тестируемых антител. Каждый цикл состоял из введения антигена (His-меченного ВКД TREM2) с последующей инъекцией анализируемого антитела к иммобилизованным антителам. В конце каждого цикла поверхность иммобилизованных антител регенерировали путем введения буфера с низким рН (рН = 3), содержащего 1,25 М NaCl. Данные эпитоп-специфической сортировки оценивали с помощью программного обеспечения Carterra для создания конкурентной матрицы и групп эпитопов. Результаты представлены в таблице 2.

Две группы агонистов были определены с помощью эпитоп-специфической сортировки антител к TREM2: (1) агонисты, связывающие стеблевую область, и (2)

агонисты, связывающие домен IgV. Антитела в пределах одних и тех же групп демонстрировали одну и ту же функцию, например, ингибирование активации pSyk TREM2-DAP12 липидным лигандом (антагонистические антитела), активации pSyk только антителом (агонисты, связывающие стеблевую область, агонисты, связывающие домен IgV).

Таблица 2. Сортировка антител к TREM2, аннотированные по функциональному классу

Группа 1	Группа 2
Агонисты стеблевой области	Агонист IgV
CL0020188	CL0020123

Пример 5. Связывание антител с пептидом стеблевой области TREM2

Антитела к TREM2 были оценены на связывание с пептидами стеблевой области TREM2 человека и мыши. В число протестированных пептидов входили: (1) полноразмерная стеблевая область (аминокислоты 129–172 TREM2 человека, UniProtKB Q9NZC2; аминокислоты 131–169 TREM2 мыши, UniProtKB Q99NH8) и (2) усеченный пептид стеблевой области, содержащий сайт расщепления ADAM10/17 (аминокислоты 149–163 TREM2 человека/мыши). Связывание антител с пептидами стеблевой области TREM2 определяли с помощью стандартного «сэндвич»-ИФА. Вкратце, 96-луночный планшет для ИФА с половинным объемом лунок был покрыт стрептавидином на ночь при 4°C. На следующий день биотинилированные пептиды стеблевой области TREM2, разведенные в 1% BSA/PBS, добавляли в планшет и инкубировали в течение 1 часа. Затем добавляли антитела, разведенные в 1% BSA/PBS, и инкубировали в течение 1 часа. Антитела, связанные с пептидом, выявляли с помощью конъюгированного с ПХ вторичного антитела к человеческой каппа-цепи (Bethyl Laboratories, Inc.), разведенного в 1% BSA/PBS. Планшеты анализировали путем реакции с реагентом для обнаружения (One-step TMB Ultra, Thermo) и измерением оптической плотности при 450 нм (A450) с помощью стандартного спектрофотометрического оборудования (BioTek®). Результаты представлены в таблице 3, ниже. Данные представлены в виде нормализованных значений (кратность по отношению к фону, где фон = изотипический контроль).

Таблица 3. Связывание антитела к TREM2 с пептидами стеблевой области TREM2

	Изотип	CL0020188	CL0020123
Связывание пептида TREM2 человека (АК 149–163)	1,0	3,0	1,2
Связывание пептида TREM2 человека (АК 129–172)	1,0	51	1,2
Связывание пептида TREM2 мыши (АК 149–163)	1,0	0,9	0,9
Связывание пептида TREM2 мыши (АК 131–169)	1,0	33	1,0

В таблице 3 показаны взаимодействия связывания стеблевой области пептида человека и мыши с антителом, которые подтверждают данные эпитоп-специфической сортировки в таблице 2. Исходя из данных, приведенных в таблице 3, сайт, на котором связываются определенные антитела к TREM2, соответствует аминокислотам 129–148 во внеклеточной стеблевой области TREM2.

Способность антител к TREM2 ингибировать расщепление пептида стеблевой области TREM2 при помощи ADAM17 также анализировали с помощью анализа методом поляризации флуоресценции. Пептиды стеблевой области TREM2 сначала готовили в буфере для анализа (25 мМ Tris pH 7,5, 2,5 мкМ ZnCl<sub>2</sub>, 0,005% Brij-35) со стрептавидином. Затем антитела к TREM2 предварительно инкубировали с пептидами стеблевой области TREM2 в течение 30 минут при комнатной температуре. После периода предварительной инкубации добавляли ADAM17 (R&D systems, кат. № 930-ADB) и инкубировали с пептидами в течение 20 часов при 37°C. На следующий день образцы дополнительно разводили в буфере для анализа и переносили в черный непрозрачный 384-луночный планшет. Поляризацию флуоресценции впоследствии измеряли на планшетном ридере Perkin Elmer EnVision. Поляризацию флуоресценции пептидов стеблевой области TREM2, предварительно инкубированных с антителом к TREM2, сравнивалась с поляризацией флуоресценции полноразмерного пептида стеблевой области TREM2 и контроля с ферментом (полноразмерный пептид стеблевой области TREM2 с ADAM17).

Антитела, связывающие стеблевую область TREM2, значительно увеличивали поляризацию флуоресценции, демонстрируя частичное ингибирование расщепления пептида стеблевой области под действием ADAM17 (клоны CL0020141, CL0020188, CL0020313, CL0020308). IgV-связывающее антитело CL0020107 не связывало пептид стеблевой области TREM2 и, таким образом, не оказывало влияния на расщепление пептида в анализе методом поляризации флуоресценции.

#### Пример 6. Фармакокинетический анализ антител к TREM2

Фармакокинетические профили антител к TREM2 оценивали на мышах. Мышей C57BL/6J, приобретенных в Jackson Laboratory (кат. № 000664) в возрасте 2 месяцев, использовали для 7-дневного фармакокинетического (фК) исследования и исследования взаимодействия с мишенью. Гомозиготные по KI мыши с кДНК Trem2 человека (*huTrem2<sup>KI/KI</sup>*) были использованы для 24-часового исследования взаимодействия с мишенью в возрасте 3 месяцев. Получение и разведение гомозиготных по KI мышей с кДНК Trem2 человека описано ниже.

Получение модели гомозиготной по KI мыши с кДНК Trem2 человека.

Гомозиготную по KI мышь с кДНК TREM2 человека (*huTrem2<sup>KI/KI</sup>*) получали

следующим образом. Последовательность кДНК Trem2 человека - полиА человека была вставлена за эндогенным стартовым кодом ATG Trem2 мыши. Вставка кДНК Trem2 человека - полиА привела к замене последовательности экзона1 Trem2 мыши, что позволяет экспрессировать кДНК Trem2 человека под управлением эндогенного мышинового промотора и нарушает экспрессию эндогенного Trem2 мыши. *huTrem2<sup>KI/KI</sup>* мышь получали на генетическом фоне C57BL/6 с помощью гомологичной рекомбинации.

Для нацеливающего вектора *huTrem2<sup>KI/KI</sup>* длинное плечо гомологии (LA) простирается примерно на 3,6 т.о. против хода транскрипции от 5'-конца последовательности кДНК Trem2 человека-pA, а короткое плечо гомологии (SA) простирается примерно на 2,3 т.о. по ходу транскрипции от 3' до FRT-фланкированной Neo кассеты. Оба длинных и коротких гомологичных плеча были амплифицированы из ВАС-клона C57BL/6 (RP23: 358G22) и затем субклонировали в базовый вектор pSP72 (Promega) размером ~2,4 т.о., содержащий кассету для селекции ампициллином. FRT-фланкированная неомициновая кассета hUBS-gb2 была вставлена непосредственно по ходу транскрипции от кассеты hTrem2-pA, в результате чего получился нацеливающий вектор размером около 13,6 т.о. Десять (10) мкг нацеливающего вектора были линейаризованы с помощью рестрикционного фермента Not I (New England Biolabs) и затем трансфицированы в эмбриональные стволовые (ЭС) клетки FLP C57Bl/6 (B6) методом электропорации. После селекции антибиотиком G418 выжившие клоны размножали для проведения анализа методом ПЦР с целью выявления положительных рекомбинантных ЭС клонов. Последовательности праймеров для ПЦР-скрининга (SEQ ID NO:53 = 5'-AGG AAT GTG GGG AGC ACG GAG-3' и SEQ ID NO:54 = 5'- TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG GTG-3') амплифицировали фрагмент размером 2,81 т.о., содержащий область по ходу транскрипции от элемента bghpA до части короткого гомологического плеча (SA) за пределами 3' области. Пять клонов были идентифицированы как положительные и отобраны для дальнейшего размножения. Neo кассету удаляли трансгеном Flp во время размножения ЭС клона.

Геномную ДНК, выделенную из пяти положительных клонов, была сначала охарактеризована с помощью анализа методом секвенирования. Продукт размером 1,19 т.о. был амплифицирован и секвенирован с помощью праймеров (SEQ ID NO:55 = 5'- ACC STA GTC CTG ACT GTT GCT C-3'; SEQ ID NO:56 = 5'- TAT AGG AAC TTC GCG ACA CGG ACA C-3') для подтверждения соединения 5' генома/Neo кассеты и соединений 3' KI кассеты. Результаты секвенирования подтвердили введение последовательности кДНК Trem2 человека-pA во все пять клонов.

Пять положительных клонов были дополнительно охарактеризованы методом

Саузерн-блоттинга с использованием зондов, направленных против короткого и длинного плеча. Геномная ДНК ЭС клеток, расщепленная с помощью *Ssp I* и *Vam HI*, была гибридизована с коротким и длинным плечом зонда, соответственно. Было подтверждено, что все пять ЭС клонов имеют правильные события гомологичной рекомбинации как в длинном, так и в коротком плечах. Последовательности праймеров для амплификации зонда короткого плеча (658 п.н.) представляют собой (SEQ ID NO:57 = 5'- ACA GGA GGG ACC TAC CTT CAG 3'; SEQ ID NO:58 = 5'- GCC TGC CTT TCA GAG ACC TCA GTC -3). Последовательности праймеров для амплификации зонда длинного плеча (681 п.н.) представляют собой (SEQ ID NO:59 = 5'- CCT CTC CGG CTG CTC ATC TTA CTC -3'; SEQ ID NO:60 = 5'- GTC TCT CAG CCC TGG CAG AGT TTG -3').

Затем все пять клонов ЭС клеток были введены в бластоцисты C57BL/6. У мышат из одного клона была подтверждена трансмиссия зародышевой линии путем генотипирования методом ПЦР. Праймеры для генотипирования представляют собой (SEQ ID NO:61 = праймер 1: 5'- CGC CTA CCC TAG TCC TGA CTG TTG -3', SEQ ID NO:62 = праймер 2: 5'- AAA GCC TAC AGC ATC CTC ACC TC -3'; и SEQ ID NO:63 = праймер 3: 5'- GCA TCA TGG GGT TGT AGA TTC CG -3'). ПЦР-продукт для праймера 1/праймера 2 у дикого типа составляет 658 п.н. ПЦР-продукт для праймера 1/праймера 3 на аллеле KI составляет 469 п.н.

#### Введение доз антител и сбор плазмы/КСФ

Для ФК анализа мышам C57BL/6J внутривенно (в/в) вводили антитела к TREM2 или контрольный IgG в дозе 10 мг/кг в хвостовую вену (объем дозы около 200 мкл/мышь, n = 3 для каждой группы). Образцы крови собирали через 1 час, 24 часа, 4 дня и 7 дней после введения. Образцы крови в первые три временные точки были взяты посредством забора крови из нижнечелюстного сосуда с помощью 3-миллиметровых скарификаторов (скарификаторы для животных GoldenRod). Последний и терминальный образец крови на 7-й день был взят посредством пункции сердца. Кровь собирали в пробирки с ЭДТА (Sarstedt Microvette 500 КЗЕ, кат. № 201341102), медленно переворачивали для перемешивания и центрифугировали при 4°C. Слой (верхний) плазмы переносили в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл и хранили при -80°C до анализа.

Для 24-часового исследования взаимодействия с мишенью использовали мышей C57BL/6J для тестирования мышинных суррогатных антител к TREM2, и мышей *huTrem2<sup>KI/KI</sup>* для тестирования антител к TREM2 человека. Мышам вводили антител к TREM2 или контрольный IgG в дозе 100 мг/кг путем внутривенного (в/в) введения в хвостовую вену (объем дозы около 200 мкл/мышь, n = 5 для каждой группы). Образцы крови собирали за 24 часа до введения дозы для определения исходного уровня TREM2.

Через 24 часа после введения дозы были собраны терминальные образцы крови и ЦСЖ. Получение плазмы проводили, как описано выше. Для взятия образца ЦСЖ был сделан сагиттальный разрез в задней части черепа, подкожная клетчатка и мышцы были отделены, чтобы обнажить заднюю мозжечково-мозговую цистерну. Для пункции задней мозжечково-мозговой цистерны и сбора образца ЦСЖ использовали предварительно вытянутую стеклянную капиллярную трубку. Затем ЦСЖ центрифугировали при 4°C для удаления остатков крови, а супернатант ЦСЖ переносили в 0,5 мл пробирку Эппендорфа с низким содержанием белка LoBind (Eppendorf, кат. № 022431064) для хранения при -80°C до проведения анализа.

#### Анализ уровней антитела к TREM2 в плазме *in vivo*

Для ФК анализа антитела к TREM2 общую концентрацию антитела в плазме мыши определяли с помощью общего «сэндвич»-ИФА с человеческим анти-Fc. На 384-луночный планшет MaxiSorp был покрыт в течение ночи 1 мкг/мл поликлонального анти-huFc ослиного антитела (Jackson ImmunoResearch). После инкубации с плазмой, разведенной 1:2000 или 1:20000 в буфере для анализа (PBST, 1% BSA), в качестве реагента для обнаружения добавляли конъюгированное с ПХ анти-huFc ослиное антитело (Jackson ImmunoResearch). Стандартные кривые были построены для каждого отдельного антитела от 2 нМ до 2,7 пМ с использованием 3-кратных разведений с помощью пятипараметрической логистической регрессии.

На фиг. 9 показаны репрезентативные фармакокинетические профили мыши для определенных антител к TREM2. Показатели клиренса антител (CL [мл/день/кг]) представлены для каждого представленного антитела в течение 7-дневного периода и сравниваются с нормальным изотипическим контролем, который не является эффекторным. Каждое антитело, приведенное на фиг. 9, демонстрировало сопоставимые показатели клиренса по сравнению с изотипическим контролем.

#### Взаимодействие с мишенью *in vivo*: Уровень sTREM2 в плазме крови

Для измерения уровня растворимого TREM2 (sTREM2) в плазме крови мышей с кДНК TREM2 человека (*huTrem2<sup>KI/KI</sup>*) обескровливали, а затем внутривенно вводили 100 мг/кг исследуемого антитела к TREM2 или изотипического контроля. Через 24 часа после введения дозы у мышей делали забор крови. Плазму получали из образцов крови и оценивали в анализе MSD, проводимом следующим образом. Планшеты MSD SECTOR были покрыты 1 мкг/мл захватывающего антитела (R+D, антитело к TREM2, кат. № MAB17291-100), разведенного в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки с образцами блокировали в течение 1 часа неразбавленным Blocker A от MSD. Образцы плазмы разводили 1:20 в 25% Blocker A от MSD в трис-буферном физиологическом

растворе, содержащем 0,05% Tween-20 (TBST), и добавляли в каждую лунку с образцом на планшете, который затем инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Детектирующее антитело (MSD, сульфо-меченное козье античеловеческое, кат. № R32AJ-1, 1:1000) затем добавляли в каждую лунку с образцом, и планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Промывку TBST проводили для каждой лунки с образцом с помощью устройства для отмывки иммунологических планшетов Biotek. Добавляли детектирующий реагент (буфер для считывания от MSD) и измеряли с помощью ридера MSD Meso Sector S600 для получения результатов связывания sTREM2 с антителами.

На фиг. 10A и 10B показаны общие уровни sTREM2 (фиг. 10A) и уровни sTREM2, связанного с антителами, (фиг. 10B) в плазме крови *huTrem2<sup>KI/KI</sup>* для иллюстративного антитела к TREM2. Данные нормализовали к исходному уровню sTREM2 до введения дозы для анализа общего и связанного sTREM2. Результаты демонстрируют, что общие уровни циркулирующего sTREM2 существенно не изменились между мышами, получавшими антитела к TREM2, по сравнению с изотипическим контролем после введения антител в течение 24 часов, что позволяет предположить, что общие уровни циркулирующего sTREM2 не изменяются в ранние моменты времени после введения дозы антител. Напротив, уровень связанного с антителами sTREM2 был выше у мышей, которым вводили антитела к TREM2, по сравнению с изотипическим контролем.

#### Пример 7. Оптимизация последовательности и гуманизация антитела к TREM2

Иллюстративные антитела к TREM2 были оптимизированы по последовательности и гуманизированы, после чего были охарактеризованы по кинетике связывания и специфичности связывания.

Оптимизацию последовательности проводили путем поиска в последовательностях CDR остатков, подверженных химической модификации (например, мотивы деамидирования аспарагина (NG), мотивы изомеризации аспарагиновой кислоты (DS) и остатки потенциального окисления (триптофан (W) и метионин (M)), и проведения аминокислотных замен на консервативные и остатки зародышевой линии для устранения таких нежелательных свойств последовательности. Гуманизированные и оптимизированные по последовательности варианты антител к TREM2 затем анализировали на кинетику связывания с помощью *Viacore* и связывания с клетками HEK293-H6 с титрованием по дозе (репрезентативные протоколы см. в Примере 1).

Результаты анализа характеристик связывания гуманизированных и оптимизированных по последовательности вариантов антитела CL0020188 представлены в таблице 4. Мотивы NG в последовательности CDR-H2 (SEQ ID NO: 5) и

последовательности CDR-L1 (SEQ ID NO: 7) CL0020188 были модифицированы, привиты к человеческим каркасным областям и проанализированы. В таблице 4 приведены значения  $K_D$ , измеренные с помощью Biacore, и значения  $EC_{50}$ , измеренные с помощью анализа связывания с титрованием по дозе на клетках HEK293-H6.

Таблица 4. Характеристики связывания оптимизированных по последовательности и гуманизированных вариантов CL0020188

Клон	hV <sub>H</sub>	hVL	K <sub>D</sub>	EC <sub>50</sub>
CL0020188-1	NG//привитой участок	NG//привитой участок	2,3 нМ	0,42 нМ
CL0020188-2	NG/3m	NG/привитой участок	3,4 нМ	0,26 нМ
CL0020188-3	NG/привитой участок	TG/привитой участок	6,8 нМ	0,64 нМ
CL0020188-4	NG/3m	TG/привитой участок	4,8 нМ	0,44 нМ
CL0020188-5	NA/привитой участок	NG/привитой участок	5,1 нМ	0,45 нМ
CL0020188-6	NA/3m	NG/привитой участок	4,0 нМ	0,31 нМ
CL0020188-7	NA/привитой участок	TG/привитой участок	10 нМ	0,68 нМ
CL0020188-8	NA/3m	TG/привитой участок	7,3 нМ	0,51 нМ
Исходное антитело			9,5 нМ	0,44 нМ

3m = A24G/L45P/V48L в V<sub>H</sub>

Как показано в таблице 4, гуманизированные и оптимизированные по последовательности клоны CL0020188 демонстрировали сходные значения аффинности в отношении hTREM2 по сравнению с исходным антителом ( $K_D = 9,5$  нМ), как было измерено Biacore. Это согласуется с результатами связывания с клетками HEK293-H6, которые представлены в таблице 4. По сравнению с исходным антителом ( $EC_{50} = 0,44$  нМ), гуманизированные и оптимизированные по последовательности клоны демонстрировали сопоставимую и субнаномолярную аффинность в отношении к TREM2, экспрессированному в клетках HEK293-H6. В целом, результаты демонстрируют сопоставимую кинетику связывания между исходным антителом и гуманизированными и оптимизированными по последовательности вариантами.

Результаты анализа характеристик связывания гуманизированных и оптимизированных по последовательности вариантов антитела CL0020123 представлены в таблице 5. Мотивы NG и DS в последовательности CDR-H2 CL0020123 (SEQ ID NO:30) были модифицированы, привиты к человеческим каркасным областям и проанализированы. В таблице 5 представлены значения  $K_D$ , измеренные с помощью Biacore, и значения  $EC_{50}$ , измеренные с помощью анализа связывания с титрованием дозы на клетках HEK293-H6.

Таблица 5. Характеристики связывания оптимизированных по последовательности и гуманизированных вариантов CL0020123

Клон	hV <sub>H</sub>	hVL	K <sub>D</sub>	EC <sub>50</sub>
CL0020123-1	NGDS (SEQ ID NO:80)/2m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,14 нМ	0,25 нМ
CL0020123-2	NGDS (SEQ ID NO:80)/1m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,18 нМ	0,23 нМ
CL0020123-3	QGDS (SEQ ID NO:81)/2m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,40 нМ	0,24 нМ

CL0020123-4	NGES (SEQ ID NO:82)/2m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,17 нМ	0,17 нМ
CL0020123-5	QGES (SEQ ID NO:83)/2m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,44 нМ	0,37 нМ
CL0020123-6	QGDS (SEQ ID NO:81)/1m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,32 нМ	0,29 нМ
CL0020123-7	NGES (SEQ ID NO:82)/1m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,15 нМ	0,19 нМ
CL0020123-8	QGES (SEQ ID NO:83)/1m	Привитой участок V <sub>H</sub>	0,39 нМ	0,38 нМ
Исходное антитело			0,10 нМ	0,26 нМ

1m = R71A в V<sub>H</sub>

2m = V67A/R71A в V<sub>H</sub>

По сравнению с исходным антителом ( $K_D = 0,10$  нМ), гуманизированные и оптимизированные по последовательности клоны демонстрировали примерно в 4 раза более высокие значения  $K_D$  для связывания с hTREM2, измеренные при помощи Biacore. С другой стороны, в анализах связывания с титрованием по дозе на клетках HEK293-H6, гуманизированные и оптимизированные по последовательности клоны демонстрировали сравнимую и субнанолярную аффинность в отношении TREM2.

Пример 8. Характеристика *in vitro* оптимизированных по последовательности гуманизированных антител к TREM2

Иллюстративные оптимизированные по последовательности и гуманизированные антитела к TREM2 (Пример 7) оценивали методами *in vitro*, как описано в Примерах 1 и 3. Антитела оценивали на связывание TREM2 в TREM2-экспрессирующих клетках HEK, TREM2-зависимый сигналинг pSyk в клетках HEK-H6, способность стимулировать выживаемость макрофагов человека и способность модулировать накопление липидов в микроглии, образованные из ИПСК. На фиг. 11–14 показаны результаты для репрезентативных антител к TREM2. Антитела к TREM2 показали хорошее связывание с клетками в анализах с TREM2-экспрессирующими клетками HEK293-H6 (значения EC50 составили 0,34 нМ (фиг. 11A) и 0,08 нМ (фиг. 11B)). Антитела к TREM2 также активировали сигналинг pSyk в TREM2-экспрессирующих клетках HEK293-H6 (фиг. 12A и 12B). Кроме того, антитела к TREM2 индуцировали выживаемость макрофагов, причем лучшую активность, способствующую выживаемости, наблюдали для варианта антитела CL0020188 (фиг. 13). Наконец, антитела к TREM2 продемонстрировали способность снижать накопление липидов в образованной из ИПСК микроглии, обработанной миелином (фиг. 14A и 14B).

Пример 9. ФК оптимизированных по последовательности, гуманизированных антител к TREM2 у мышей

Фармакокинетические профили определенных оптимизированных по последовательности гуманизированных антител к TREM2 (Пример 7) оценивали у мышей дикого типа в 7-дневном фармакокинетическом (фК) исследовании, аналогичном описанному в Примере 6. Каждая дозовая группа включала n=3 мышей. В таблице 6

приведены ФК свойства иллюстративных оптимизированных по последовательности и гуманизированных антител к TREM2 (Пример 7).

Таблица 6. Свойства антитела к TREM2 для ФК у мышей

Клон	Доза (мг/кг)	C <sub>0</sub> (мкМ)	AUC <sub>0-inf</sub> (мкМ*ч)	CL (мл/день/кг)
Вариант CL0020188	10	1,14 ± 0,05	207,78 ± 43,30	8,14 ± 1,80
Вариант CL0020188	50	6,48 ± 0,61	236,49 ± 2,67	34,58 ± 0,39
Вариант CL0020123	10	1,4999	223,1	13,2
Эталонное антитело к BACE	10	1,017	60,19	33,3

Пример 10. ФК оптимизированных по последовательности, гуманизированных антител к TREM2 у яванского макака

Фармакокинетические профили антител к TREM2 оценивали у наивных яванских макаков. Наивным яванским макакам в возрасте 2–4 лет (массой около 2-3 кг) вводили антитело к TREM2 путем внутривенной болюсной инъекции. Вводимые дозы включали 3 мг/кг и 25 мг/кг, n=3 обезьян в каждой группе. Образцы крови (около 1 мл) были взяты до введения дозы и через 10 минут, 30 минут, через 1, 6, 12 и 24 часа, а также через 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 и 28 дней после введения дозы. Образцы охлаждали примерно до 5°C перед центрифугированием для получения плазмы, и полученную плазму выдерживали на сухом льду перед хранением при -70°C до анализа. Образцы плазмы анализировали на уровни антител к TREM2 следующим образом.

Для ФК анализа антител к TREM2 общие концентрации антител в плазме обезьян определяли количественно с помощью общего электрохемилюминесцентного иммуноанализа сэндвич-типа (ECLIA) с антителом к IgG человека на платформе Meso Scale Discovery (MSD). Вкратце, 1% блокирующего буфера PBS на основе казеина (Thermo Scientific, штат Массачусетс) добавляли в 96-луночный покрытый стрептавидином микротитрационный планшет с малыми пятнами MSD GOLD (Meso Scale Discovery, штат Мэриленд) и инкубировали в течение приблизительно 1 часа. После блокировки и промывки планшета, биотинилированное козьё антитело к IgG человека (SouthernBiotech, штат Алабама) в рабочем растворе 0,5 мкг/мл добавляли в аналитический планшет и оставляли инкубироваться на 1-2 часа. После инкубации и промывки образцы плазмы (т.е. образцы с гуманизированными антителами к TREM2) добавляли в аналитический планшет и инкубировали в течение 1-2 часов. Обратите внимание, что перед добавлением в аналитический планшет образцы должны быть разведены в минимально необходимом для анализа разведении (MRD) 1:100 в 0,5% буфере для анализа PBS на основе казеина (Thermo Scientific, штат Массачусетс), что приводит к получению конечной 1% матрицы плазмы. После захвата антителом к TREM2 и промывки вторичное рутенированное (сульфо-меченное) козьё антитело к IgG человека (Meso Scale Discovery, штат Мэриленд) в рабочем растворе 0,4 мкг/мл добавляли

в аналитический планшет и инкубировали в течение приблизительно 1 часа. Наконец, после инкубации и промывки в планшет добавляли буфер для считывания результатов анализа (1X буфер для считывания T от MSD) для получения сигналов образцов для анализа. Сигналы, считываемые с образцов с помощью планшетного ридера от MSD, были в виде электрохемилюминесцентных (ЭХЛ) сигналов и выражались в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все описанные ранее стадии реакции были выполнены при температуре окружающей среды и встряхивании на штрейкере для планшетов (при необходимости). Анализ имел динамический диапазон калибровочного стандарта 19,5 – 2500 нг/мл (или 0,195 – 25 нг/мл в после MRD 1:100), серийно разведенного по 8 стандартным точкам в соотношении 1:2, плюс холостой образец плазмы. Концентрация образца плазмы была вычислена по калибровочной стандартной кривой, которая была аппроксимирована с помощью взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессии. В таблице 7 приведены фармакокинетические (фК) свойства иллюстративного оптимизированного по последовательности и гуманизованного антитела к TREM2 (Пример 7).

Таблица 7. Фармакокинетические свойства антитела к TREM2 у яванских макак

Клон	Доза (мг/кг)	AUC <sub>0-inf</sub> (мкМ*ч)	CL (мл/день/кг)
Вариант CL0020188	25	899,0 ± 53	4,46 ± 0,26
Вариант CL0020188	3	61,2 ± 6,3	7,90 ± 0,77

Вариант CL0020188 демонстрировал аналогичные низкие уровни клиренса между различными уровнями доз и линейный фармакокинетический профиль у яванских макак. Кроме того, не было обнаружено клинических патологий, связанных с введением варианта у яванских макак (данные не показаны).

#### Пример 11. Сравнение антител к TREM2

Аффинность антител к TREM2 к человеческому TREM2 и TREM2 яванского макака измеряли с помощью Biacore (описано в Примере 1). Активность антител к TREM2 измеряли в образцах ЦСЖ здоровых людей-добровольцев (Innovative Research) и образцах ЦСЖ здоровых яванских макак (Worldwide Primates) с помощью анализа MSD. Активность каждого антитела определяли по его EC50. Вкратце, 96-луночные покрытые стрептавидином планшеты с малыми пятнами MSD GOLD (MSD, кат. № L45SA), покрытые захватывающим антителом (биотинилированное козье антитело к TREM2 человека, R&D Systems, кат. № BAF1828) инкубировали с образцами биологической жидкости, разведенными 1:3 в буфере для анализа (25% (об/об) Blocker A от MSD (MSD, кат. № R93BA-A), 75% (об/об) TBST) в течение одного часа при комнатной температуре. После промывки лунок TBST, сульфо-меченное антитело к TREM2 добавляли в серийном разведении (4-кратное разведение по 11 точкам) в лунки планшета и инкубировали в

течение часа при комнатной температуре. Лунки промывали в TBST, затем в них добавляли буфер для считывания MSD (MSD, кат. № R92TC-3). Сигналы от образцов измеряли с помощью прибора MSD Meso Sector S600. Значения EC50 для каждого антитела определяли с помощью четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменной угловым коэффициентом. Эталонные антитела №1 и №2 соответствуют 4C5 и 6E7, описанным в WO 2018/195506. Эталонное антитело №3 соответствует AL2p-58, описанному в WO 2019/028292. Вариабельные области эталонного антитела №1 представлены в SEQ ID NO:73 и 74. Вариабельные области эталонного антитела №2 представлены в SEQ ID NO:75 и 76. Вариабельные области эталонного антитела №3 представлены в SEQ ID NO:77 и 78. Результаты представлены в таблице 8.

Как показано в таблице 8, варианты CL0020188 и CL0020123, описанные в данном документе, по сравнению с эталонными антителами, обладают более сильной аффинностью в отношении TREM2 человека и более сильным связыванием sTREM2 в образцах ЦСЖ, выделенных из здоровых людей-добровольцев. Кроме того, варианты CL0020188, по сравнению с эталонными антителами, обладают более сильной аффинностью в отношении TREM2 яванского макака и более сильным связыванием sTREM2 в образцах ЦСЖ, выделенных от здоровых яванских макаков. Об этом свидетельствует относительное количество антитела, необходимое для достижения полумаксимальной эффективной концентрации для связывания данного количества sTREM2 при тех же условиях (EC50). Как показано в таблице 8, для достижения EC50 необходимы более высокие относительные количества эталонных антител №1, №2 и №3 по сравнению с антителами CL0020188 и CL0020123.

Таблица 8. Сравнение свойств антитела к TREM2

Антитело	K <sub>D</sub> (нМ) TREM2 человека	K <sub>D</sub> (нМ) TREM2 яванского макака	EC50, связанный sTREM2 в ЦСЖ человека [нМ]	EC50, связанный sTREM2 в ЦСЖ яванского макака [нМ]
CL0020188-4	1,4	1,5	0,29	0,28
CL0020188-7	3,3	2,8	0,75	0,72
CL0020123-5	0,63	9,3	1,00	49,41
CL0020123-7	0,08	9,4	0,54	16,88
Эталонное антитело №1	5,9	14	32,6	81,6
Эталонное антитело №2	4,3	9,2	7,4	6,5
Эталонное антитело №3	8,7	9,2	7,25	33,72

Пример 12. Картирование эпитопов антитела к TREM2

Для идентификации эпитопов антитела к TREM2 на пептидном уровне использовали масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX). Рекombинантный TREM2 человека отдельно или в смеси с антителом к TREM2 инкубировали с буфером для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфата натрия, 100 мМ

хлорида натрия, рН 7,0) в течение 0, 60, 600 и 3600 секунд при 20°C. Водород-дейтериевый обмен останавливали путем добавления равного объема 4 М гуанидингидрохлорида, 0,85 М буфера ТСЕР (конечный рН – 2,5). Погашенные образцы затем подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII и анализу методом ЖХ-МС. Вкратце, погашенные образцы вводили в упакованную колонку пепсин/протеаза XIII (2,1 x 30 мм) при 20°C, и полученные пептиды анализировали с помощью системы СВЭЖХ-МС, состоящей из Waters Acquity UPLC (Waters Corporation), соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ HF-Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher). Пептиды разделяли на колонке C8 размером 50 мм x 1 мм при температуре -6°C с использованием 16,5-минутного градиента от 2% до 31% растворителя В (растворитель В: 0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле; растворитель А: 0,2% муравьиной кислоты в воде). Масс-спектры регистрировали в режиме только МС. Необработанные данные МС обрабатывали с помощью программы HDX Workbench (Pascal et al. 2012. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 23:1512-1521). Уровни дейтерия вычисляют с помощью средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой на t0. Идентификацию пептидов проводили путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью TREM2 человека с помощью программного обеспечения Mascot (Matrix Science). Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составлял 10 ч./млн и 0,02 Да, соответственно.

По результатам масс-спектрометрии HDX, CL0020188 и варианты CL0020188 связываются с TREM2 человека (SEQ ID NO:1) на аминокислотных остатках 143–149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69)), а CL0020123 и варианты CL0020123 связываются с TREM2 человека на (i) аминокислотных остатках 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)), (ii) аминокислотах 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) и (iii) аминокислотных остатках 126-129 (VEVL (SEQ ID NO:72)).

#### IX. Неофициальный перечень последовательностей

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
1	MEPLRLLILLFVTELSGAHNNTTVFQGVAGQSLQVSCPYS MKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRR WNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSE ADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESSEFEDAHVE HSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIFLIKILAASALWAAAWH GQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPLGLRDT	Белок TREM2 человека
2	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWIRQP PGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNQNI LYLQMNTRLAEDTAIYYCARLSYGFYWGQGVMTVSS	V <sub>H</sub> CL0020306
3	DIVMTQGALPNPVPSPGESASITCQSSKSLLSNGKTYLNW YLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEDVGVYYCQQFLEFPFTFGSGTKLEIK	VL CL0020306

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
4	GFTFTDFYMS	CDR-H1 CL0020306; CDR-H1 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
5	VIRNKANGYTAGYNPSVKG	CDR-H2 CL0020306; CDR-H2 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, и CL0020188-4
6	ARLSYGFYD	CDR-H3 CL0020306
7	QSSKSLLSNGKTYLN	CDR-L1 CL0020306; CDR-L1 CL0020307; CDR-L1 CL0020307-1; CDR-L1 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-5, и CL0020188-6
8	WMSTRAS	CDR-L2 CL0020306; CDR-L2 CL0020307; CDR-L2 CL0020307-1; CDR-L2 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
9	QQFLEFPFT	CDR-L3 CL0020306; CDR-L3 CL0020307; CDR-L3 CL0020307-1
10	EVKLLSEGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTNFYMSWIRQP PGRAPWLGVIRNRPNGYTTDYN PSVKG RFTISRDNQTQNI LYLQMSLRLRADDTA FYCYTRLTYGFDYWGQGV MVTVSS	V <sub>H</sub> CL0020307
11	DIVMTQGALPNPVPSGESASITC QSSKSLLSNGKTYLNW YLQRPQSPQLLIYWMSTRASGV SDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEVVG VYCYQQFLEFPFT FGSGTKLEIK	VL CL0020307
12	GFTFTNFYMS	CDR-H1 CL0020307
13	VIRNRPNGYTTDYNPSVKG	CDR-H2 CL0020307
14	TRLTYGFDY	CDR-H3 CL0020307

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
15	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWIRQP PGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNQNI LYLQMNTRLAEDTAIYYCARLTYGFDYWGQGVMTVSS	V <sub>H</sub> CL0020188
16	DIVMTQGALPNPVPSPGESASITCQSSKSLHNSGKTYLNW YLQRPQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGSGTKLEIK	VL CL0020188
17	ARLTYGFDY	CDR-H3 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
18	QQFLEYPFT	CDR-L3 для CL0020188 и вариантов CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGLTV SS	V <sub>H</sub> CL0020188-1; V <sub>H</sub> CL0020188-3
20	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCSKSLHNSGKTYLNWY LQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEIK	VL CL0020188-1; VL CL0020188-2; VL CL0020188-5; VL CL0020188-6
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGLTV SS	V <sub>H</sub> CL0020188-2
22	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCSKSLHNSGKTYLNWY LQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEIK	VL CL0020188-3; VL CL0020188-4; VL CL0020188-7; VL CL0020188-8
23	QSSKSLHNSGKTYLN	CDR-L1 для вариантов CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-7, и CL0020188-8
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGLTV SS	V <sub>H</sub> CL0020188-5; V <sub>H</sub> CL0020188-7

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
25	VIRNKANAYTAGYNPSVKG	CDR-H2 для вариантов CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQ APGKGPEWLSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGT LVTVS S	V <sub>H</sub> CL0020188-6; V <sub>H</sub> CL0020188-8
27	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFSIEDFYIHWVKQR PEQGLEWIGWIDPENGDSKYAPKFQ GKATMTADTSSNTA YLHLSLTS EDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGTSVT VSS	V <sub>H</sub> CL0020123
28	DIQMNQSPSSLSASLGDTVITICHASQHIN VWLSWYQQKP GDHPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLT ISSLQPED IATYYCQQGQTYPRTFGGG TKLEIK	VL CL0020123
29	GFSIEDFYIH	CDR-H1 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1, CL0020123-2, CL0020123-3, CL0020123-4, CL0020123-5, CL0020123-6, CL0020123-7, и CL0020123-8
30	WIDPENGDSKYAPKFQG	CDR-H2 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1 и CL0020123-2
31	HADHGNYGSTMDY	CDR-H3 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1, CL0020123-2, CL0020123-3, CL0020123-4, CL0020123-5, CL0020123-6, CL0020123-7, и CL0020123-8
32	HASQHIN VWLS	CDR-L1 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1, CL0020123-2, CL0020123-3, CL0020123-4, CL0020123-5, CL0020123-6, CL0020123-7, и CL0020123-8

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
33	KASNLHT	CDR-L2 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1, CL0020123-2, CL0020123-3, CL0020123-4, CL0020123-5, CL0020123-6, CL0020123-7, и CL0020123-8
34	QQGQTYPRT	CDR-L3 для CL0020123 и вариантов CL0020123-1, CL0020123-2, CL0020123-3, CL0020123-4, CL0020123-5, CL0020123-6, CL0020123-7, и CL0020123-8
35	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPENGDSKYAPKFQGRATITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-1
36	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQVIVLWVSWYQQKPK GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGQTYPRTFGQGTKVEIK	CL0020123-1 VL; CL0020123-2 VL; CL0020123-3 VL; VL CL0020123-4 VL CL0020123-5; VL CL0020123-6; VL CL0020123-7; VL CL0020123-8
37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPENGDSKYAPKFQGRVTITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-2
38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPEQGDSKYAPKFQGRATITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-3
39	WIDPEQGDSKYAPKFQG	CDR-H2 для вариантов CL0020123-3 и CL0020123-6
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPENGEISKYAPKFQGRATITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-4
41	WIDPENGEISKYAPKFQG	CDR-H2 для вариантов CL0020123-4 и CL0020123-7
42	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPEQGESKYAPKFQGRATITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-5

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
43	WIDPEQGESKYAPKFQG	CDR-H2 для вариантов CL0020123-5 и CL0020123-8
44	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPEQGDSKYAPKFQGRVTITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGTLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-6
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPENGEISKYAPKFQGRVTITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGTLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-7
46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHWVRQ APGQGLEWMGWIDPEQGESKYAPKFQGRVTITADTSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTMDYWGQGTLV TVSS	V <sub>H</sub> CL0020123-8
47	W-I-D-P-E- $\beta_6$ -G- $\beta_8$ -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G, где $\beta_6$ представляет собой N или Q и $\beta_8$ представляет собой D или E	Консенсусная последовательность CDR-H2
48	G-F-T-F-T- $\beta_6$ -F-Y-M-S, где $\beta_6$ представляет собой D или N	Консенсусная последовательность CDR-H1
49	V-I-R-N- $\beta_5$ - $\beta_6$ -N- $\beta_8$ -Y-T- $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ -Y-N-P-S-V-K-G, где $\beta_5$ представляет собой K или R; $\beta_6$ представляет собой A или P; $\beta_8$ представляет собой G или A; $\beta_{11}$ представляет собой A или T; и $\beta_{12}$ представляет собой G или D	Консенсусная последовательность CDR-H2
50	$\gamma_1$ -R-L- $\gamma_4$ -Y-G-F-D-Y, где $\gamma_1$ представляет собой A или T; и $\gamma_4$ представляет собой T или S	Консенсусная последовательность CDR-H3
51	Q-S-S-K-S-L-L-H-S- $\delta_{10}$ -G-K-T-Y-L-N, где $\delta_{10}$ представляет собой N или T	Консенсусная последовательность CDR-L1
52	Q-Q-F-L-E- $\phi_6$ -P-F-T, где $\phi_6$ представляет собой Y или F	Консенсусная последовательность CDR-L3
53	AGGAATGTGGGGAGCACGGAG	Последовательность праймера
54	TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG	Последовательность праймера
55	ACCCTAGTCCTGACTGTTGCTC	Последовательность праймера
56	TATAGGAACCTTCGCGACACGGACAC	Последовательность праймера
57	ACAGGAGGGACCTACCTTCAG	Последовательность праймера
58	GCCTGCCTTTCAGAGACCTCAGTC	Последовательность праймера
59	CCTCTCCGGCTGCTCATC TТАCTC	Последовательность праймера
60	GTCTCTCAGCCCTGGCAGAGTTTG	Последовательность праймера
61	CGCCTACCCTAGTCCTGACTGTTG	Последовательность праймера
62	AAAGCCTACAGCATCCTCACCTC	Последовательность праймера

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
63	GCATCATGGGGTTGTAGATTCCG	Последовательность праймера
64	GGGGS	Последовательность линкера
65	HHHHHH	Метка 6X-His
66	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQSPGRGLEWIGRSDPTTGGTNYNEKFKTKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSSDDSAVYYCVRTSGTGDYWGQGTSLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVT	V <sub>H</sub> для антитела к TREM2 RS9.F6
67	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV <sub>H</sub> NNGNTFLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCF	VL для антитела к TREM2 RS9.F6
68	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQSSKSLLSNGKTYLNWYQKPGQPPKLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQFLEFPPTFGQGTKVEIK	VL CL0020307-1
69	FPGESES	Эпитоп TREM2
70	GEKGPCQRV	Эпитоп TREM2
71	TLRNLQPHDAGL	Эпитоп TREM2
72	VEVL	Эпитоп TREM2
73	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQVGVPLRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQADSFPRNFGQGTKLEIK	VL эталонного антитела №1
74	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGHSFTNYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAVYFCARQRTFYDSSGYFDYWGQGTLLTVSS	V <sub>H</sub> эталонного антитела №1
75	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQADSFPRTFGQGTKLEIK	VL эталонного антитела №2
76	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYFCARQRTFYDSSDYFDYWGQGTLLTVSS	V <sub>H</sub> эталонного антитела №2
77	DVVMQTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLV <sub>H</sub> SNRYTYLHWYQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPTFGQGTKLEIK	VL эталонного антитела №3
78	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYAFSSQWMNWVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLLRNQPGESYAMDYWGQGTLLTVSS	V <sub>H</sub> эталонного антитела №3
79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQAPGKGPWLSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLLTVSS	V <sub>H</sub> CL0020188-4
80	NGDS	hV <sub>H</sub> из таблицы 5
81	QGDS	hV <sub>H</sub> из таблицы 5
82	NGES	hV <sub>H</sub> из таблицы 5
83	QGES	hV <sub>H</sub> из таблицы 5

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- $\beta_6$ -F-Y-M-S (SEQ ID NO:48), где  $\beta_6$  представляет собой D или N;

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- $\beta_5$ - $\beta_6$ -N- $\beta_8$ -Y-T- $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49), где  $\beta_5$  представляет собой K или R;  $\beta_6$  представляет собой A или P;  $\beta_8$  представляет собой G или A;  $\beta_{11}$  представляет собой A или T; и  $\beta_{12}$  представляет собой G или D;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность  $\gamma_1$ -R-L- $\gamma_4$ -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:50), где  $\gamma_1$  представляет собой A или T; и  $\gamma_4$  представляет собой T или S;

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- $\delta_{10}$ -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51), где  $\delta_{10}$  представляет собой N или T;

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность WMSTRAS (SEQ ID NO:8); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- $\phi_6$ -P-F-T (SEQ ID NO:52), где  $\phi_6$  представляет собой Y или F.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором последовательность CDR-H1 выбрана из любой из SEQ ID NO:4 и 12.

3. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, в котором последовательность CDR-H2 выбрана из любой из SEQ ID NO:5, 13 и 25.

4. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 3, в котором последовательность CDR-H3 выбрана из любой из SEQ ID NO:6, 14 и 17.

5. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 4, в котором последовательность CDR-L1 выбрана из любой из SEQ ID NO:7 и 23.

6. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 5, в котором последовательность CDR-L3 выбрана из любой из SEQ ID NO:9 и 18.

7. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 6, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую



включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

8. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 7, содержащее последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26 и 79.

9. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

10. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

11. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, в котором последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:15.

12. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:24.

13. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:24.

14. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, в котором последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:24.

15. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:79.

16. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:79.

17. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, в котором последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:79.

18. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 17, содержащее последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22 и 68.

19. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с

SEQ ID NO:16.

20. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16.

21. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 20, в котором последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:16.

22. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22.

23. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22.

24. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 23, в котором последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:22.

25. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:68.

26. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 25, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:68.

27. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 26, в котором последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:68.

28. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 – 27, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:15, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:16; или

(b) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:19, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(c) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:21, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(d) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:19, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(e) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:79, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(f) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ ,

включающую SEQ ID NO:20; или

(g) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:26, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:20; или

(h) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(i) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:26, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:22; или

(j) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:2, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:3; или

(k) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:10, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:11; или

(l) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:24, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:68.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность GFSIEDFYIH (SEQ ID NO:29);

(b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность W-I-D-P-E- $\beta_6$ -G- $\beta_8$ -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G (SEQ ID NO:47), где  $\beta_6$  представляет собой N или Q и  $\beta_8$  представляет собой D или E;

(c) последовательность CDR-H3, включающую последовательность HADHGNYGSTMDY (SEQ ID NO:31);

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность HASQHINWLS (SEQ ID NO:32);

(e) последовательность CDR-L2, включающую последовательность KASNLHT (SEQ ID NO:33); и

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность QQGQTYPRT (SEQ ID NO:34).

30. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 29, в котором последовательность CDR-H2 выбрана из SEQ ID NO:30, 39, 41 и 43.

31. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-H3,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(b) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(c) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(d) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

32. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 29 – 31, содержащее последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45 и 46.

33. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 32, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27.

34. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 33, в котором последовательность  $V_H$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27.

35. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 34, в котором последовательность  $V_H$  включает SEQ ID NO:27.

36. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 29 – 35, содержащее последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85%

идентичности последовательности с SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:36.

37. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:28.

38. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 37, в котором последовательность  $V_L$  имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:28.

39. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 38, в котором последовательность  $V_L$  включает SEQ ID NO:28.

40. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:27, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:28; или

(b) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:35, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(c) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:37, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(d) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:38, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(e) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:40, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(f) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:42, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(g) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:44, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(h) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:45, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36; или

(i) последовательность  $V_H$ , включающую SEQ ID NO:46, и последовательность  $V_L$ , включающую SEQ ID NO:36.

41. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, 12 и 29;

(b) последовательность CDR-H2, включающую аминокислотную

последовательность из любой из SEQ ID NO:5, 13, 25, 30, 39, 41 и 43;

(c) последовательность CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:6, 14, 17 и 31;

(d) последовательность CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:7, 23 и 32;

(e) последовательность CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:8 и 33; и

(f) последовательность CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:9, 18 и 34.

42. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 41, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; или

(b) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; или

(c) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; или

(d) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; или



включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(k) CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

43. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 41 или п. 42, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 40, 42, 44, 45, 46 и 79.

44. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 41 – 43, содержащее вариабельную область легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, 28 и 36.

45. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 41 – 44, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; или

(b) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:10, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:11; или

(c) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16; или

(d) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20; или

(e) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:21, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO:20; или

(f) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22; или

(g) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности



(s) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 45, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36; или

(t) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 36; или

(u) последовательность  $V_H$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, и последовательность  $V_L$ , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 68.

46. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках 2, (TREM2), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, который является таким же или по существу таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020306, клона CL0020188, клона CL0020188-1, клона CL0020188-2, клона CL0020188-3, клона CL0020188-4, клона CL0020188-5, клона CL0020188-6, клона CL0020188-7, клона CL0020188-8, клона CL0020307, клона CL0020123, клона CL0020123-1, клона CL0020123-2, клона CL0020123-3, клона CL0020123-4, клона CL0020123-5, клона CL0020123-6, клона CL0020123-7 и клона CL0020123-8.

47. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 46, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, который является таким же или практически таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020123, клона CL0020123-1, клона CL0020123-2, клона CL0020123-3, клона CL0020123-4, клона CL0020123-5, клона CL0020123-6, клона CL0020123-7 и клона CL0020123-8.

48. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 47, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает одно или более из следующего в SEQ ID NO:1: (i) аминокислотные остатки 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)), (ii) аминокислоты 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) и (iii) аминокислотные остатки 126–129 (VEVL (SEQ ID NO:72)).

49. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 46, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, который является таким же или практически таким же, как эпитоп, распознаваемый клоном антитела, выбранным из группы, состоящей из: клона CL0020188, клона CL0020188-1, клона CL0020188-2, клона CL0020188-3, клона CL0020188-4, клона CL0020188-5, клона CL0020188-6, клона

CL0020188-7, клона CL0020188-8, клона CL0020307 и клона CL0020306.

50. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 49, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент распознает аминокислотные остатки 143–149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69)) в SEQ ID NO:1.

51. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, содержащий или состоящий из одного или более из следующего в SEQ ID NO:1: (i) аминокислотные остатки 55–63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70)), (ii) аминокислоты 96–107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)) и (iii) аминокислотные остатки 126–129 (VEVL (SEQ ID NO:72)).

52. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с TREM2 человека, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп, содержащий или состоящий из аминокислотных остатков 143–149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69)) в SEQ ID NO:1.

53. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–52, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент снижает уровень растворимого белка TREM2 (sTREM2).

54. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–53, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает активность TREM2.

55. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 54, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фагоцитоз или усиливает миграцию, дифференцировку, функцию или выживаемость миелоидных клеток, микроглии или макрофагов.

56. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 55, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает функцию микроглии без усиления нейровоспаления.

57. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 54, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фосфорилирование Syk.

58. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 57, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает фосфорилирование Syk в присутствии лиганда TREM2.

59. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–58, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет перекрестную

реактивность с белком TREM2 яванского макака.

60. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

61. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59, в котором антитело представляет собой химерное антитело.

62. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59, в котором антитело представляет собой гуманизованное антитело.

63. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59, в котором антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

64. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–59, в котором антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv или двухвалентный scFv.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–64 и фармацевтически приемлемый носитель.

66. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с выделенным антителом по любому из пп. 1–64 за связывание с белком TREM2 человека.

67. Набор, содержащий:

выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–64 или фармацевтическую композицию по п. 65; и инструкции по их применению.

68. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–64, или фармацевтической композиции по п. 65.

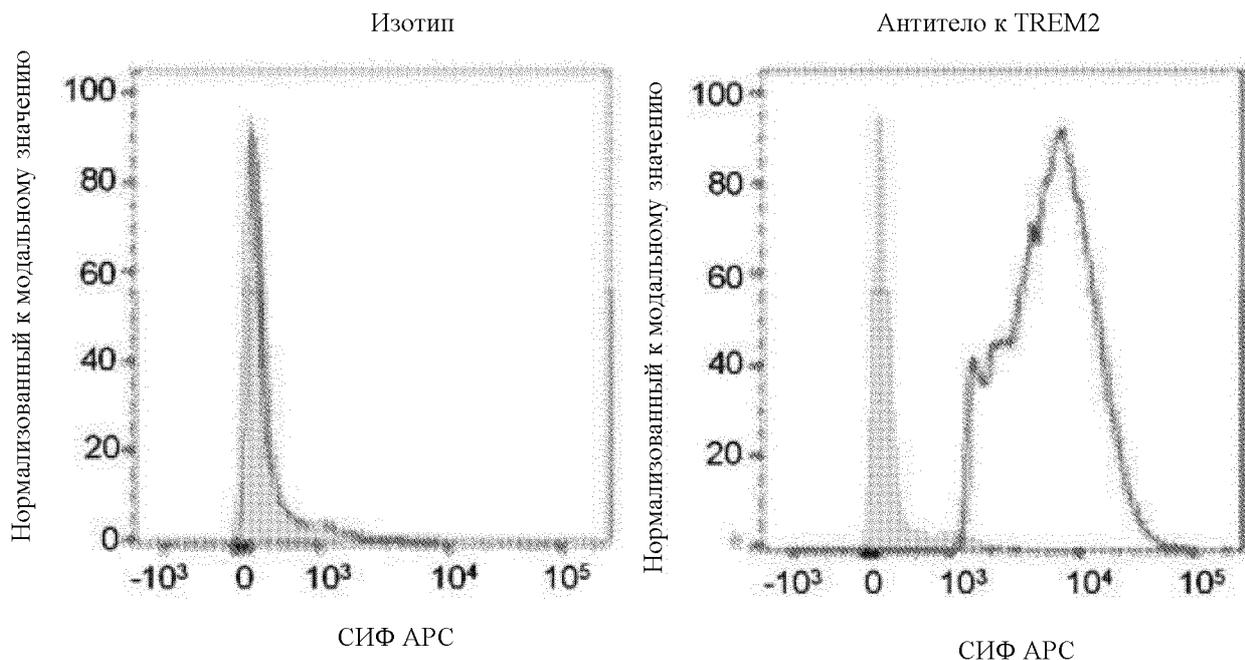
69. Способ по п. 68, в котором нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, первичной возрастной таупатии, деменции с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильными зернами, бокового амиотрофического склероза, бокового амиотрофического склероза/комплекса паркинсонизм-деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельда-Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского

типа, болезни Галлервордена-Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидами (НДЛС), миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу-Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна-Пика типа С, паллидо-понтонигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками.

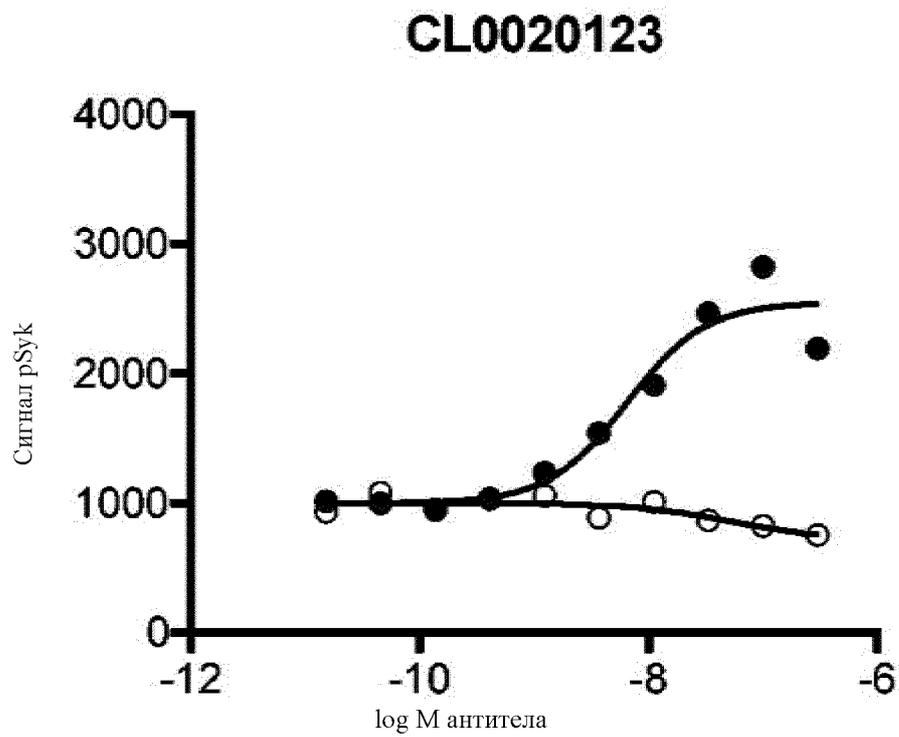
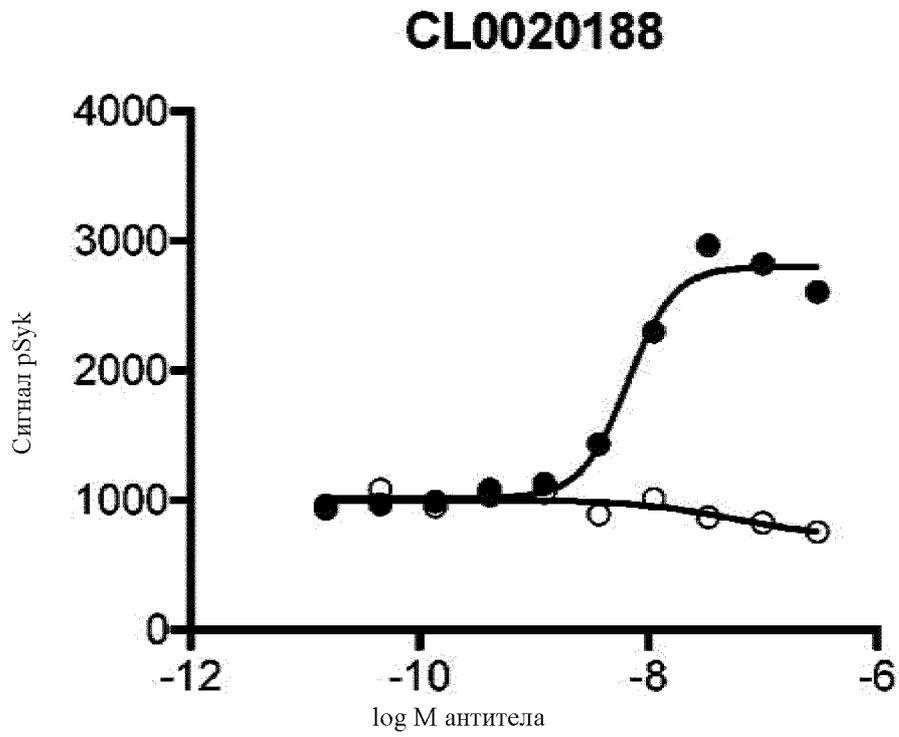
70. Способ снижения уровня sTREM2 у субъекта с нейродегенеративным заболеванием, включающий введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–64 или фармацевтической композиции по п. 65.

71. Способ повышения активности TREM2 у субъекта с нейродегенеративным заболеванием, включающий введение субъекту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–64 или фармацевтической композиции по п. 65.

Фиг. 1

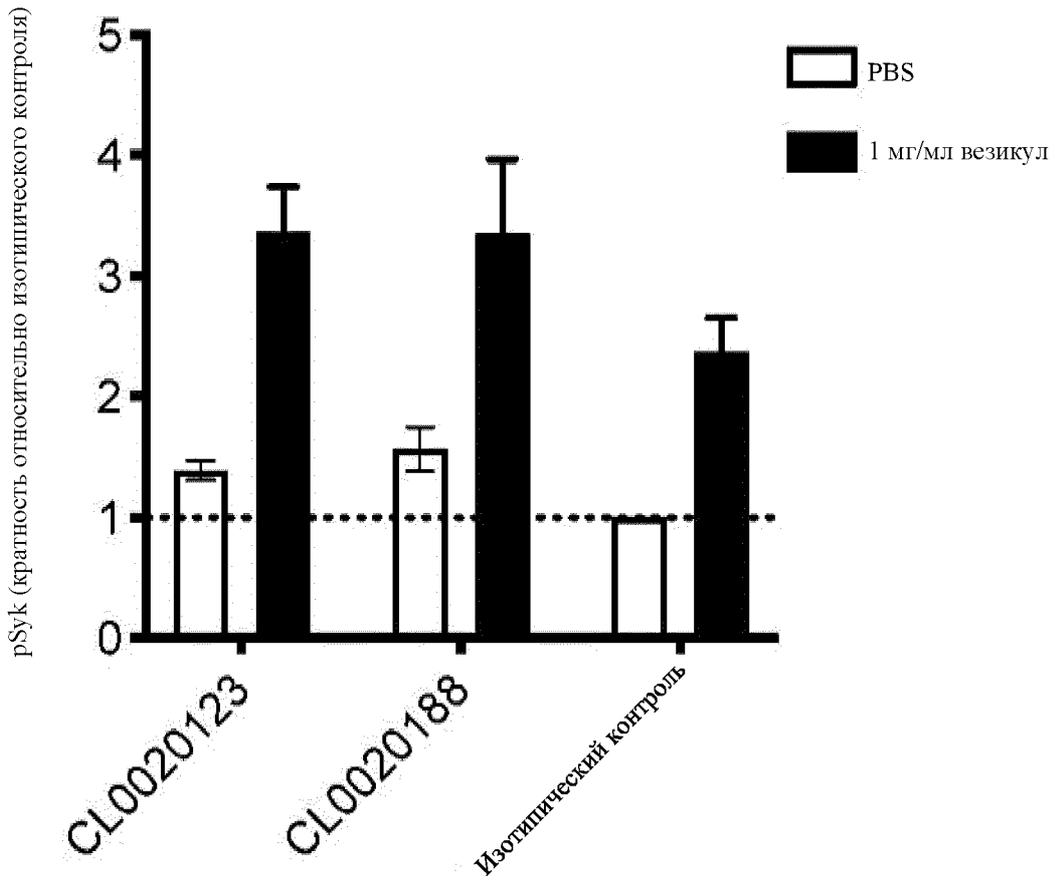


Фиг. 2



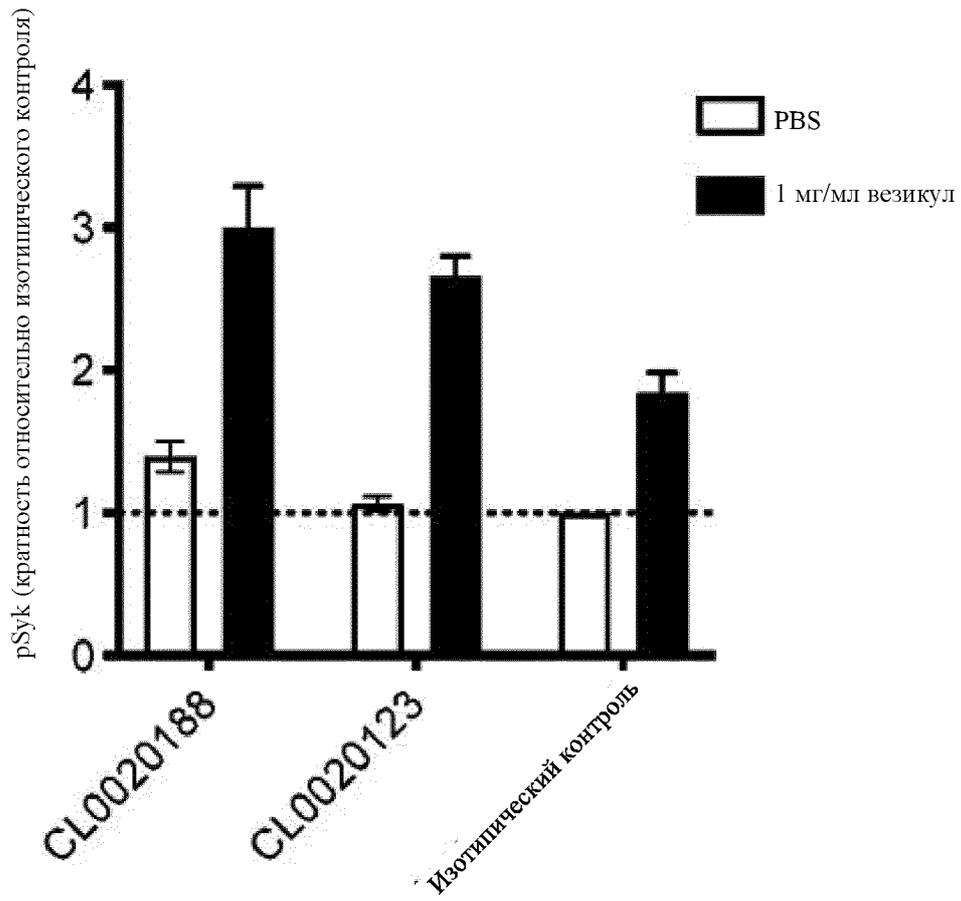
Фиг. 3А

5-минутная обработка антителами

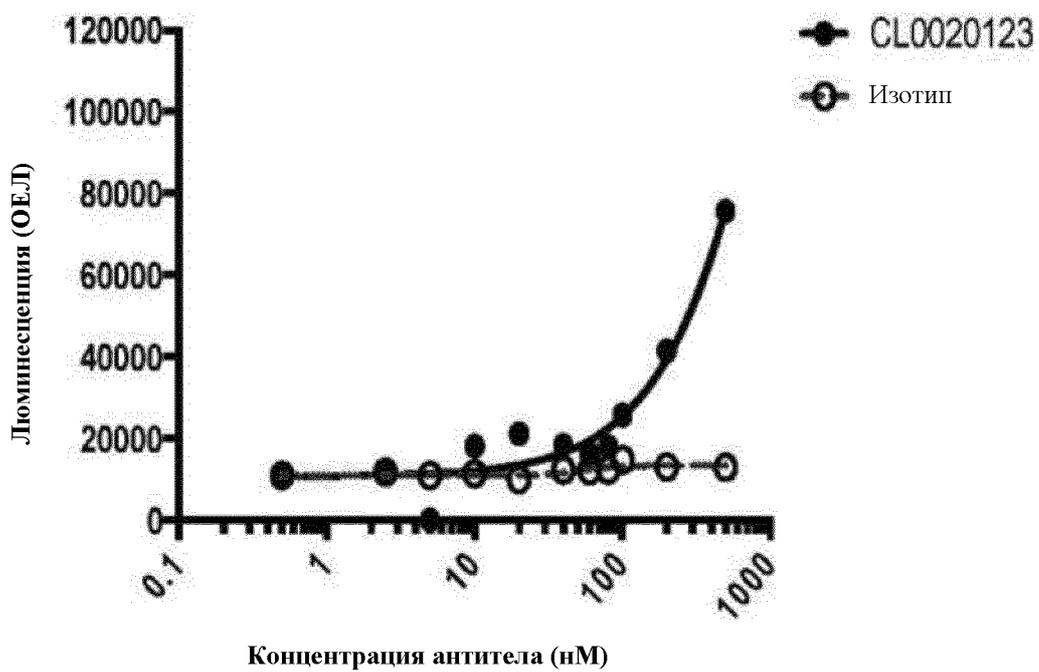
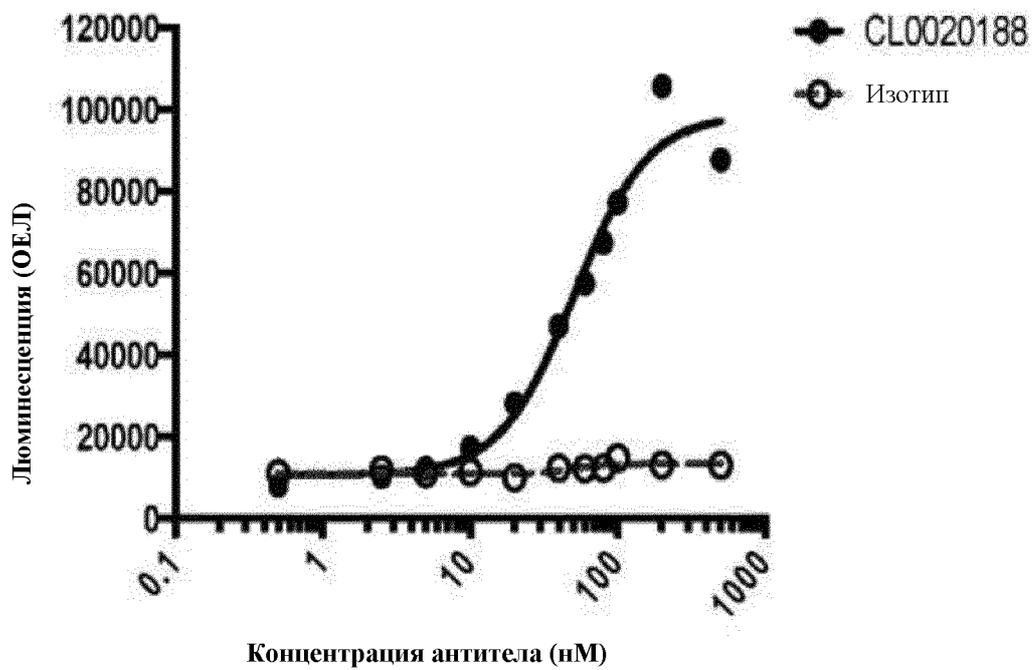


Фиг. 3В

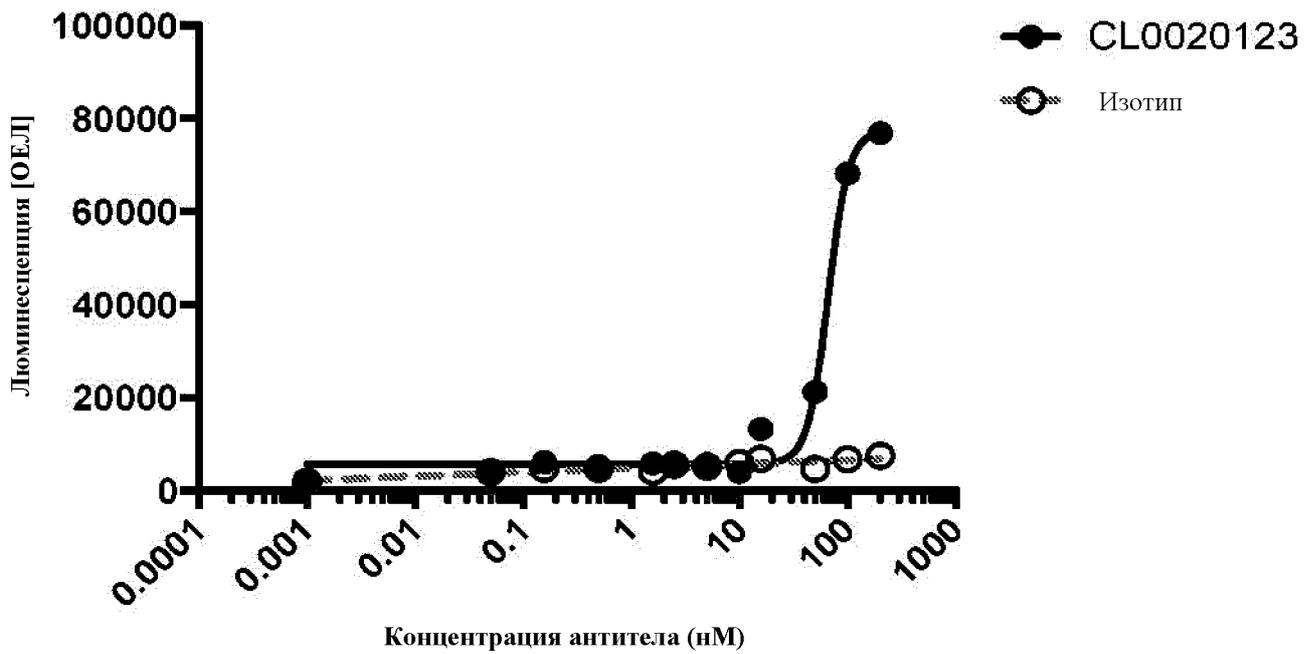
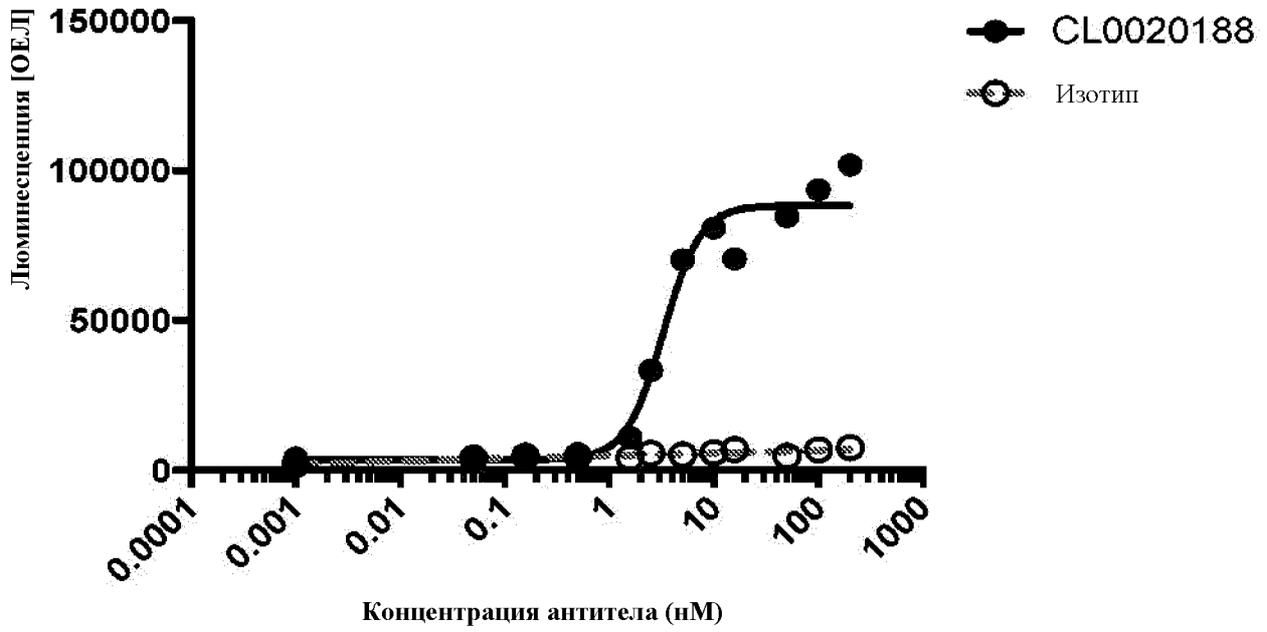
24-часовая обработка антителами



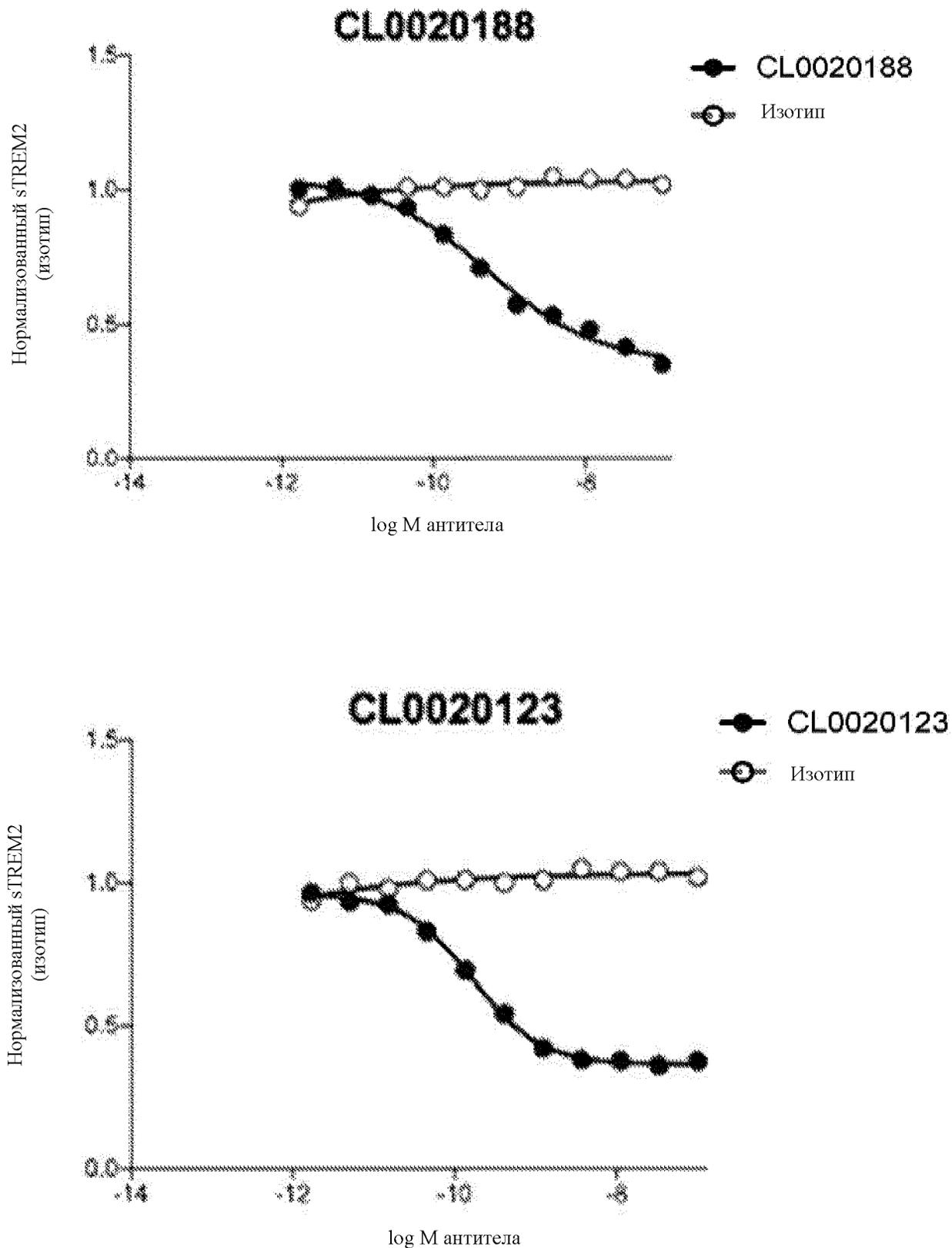
Фиг. 4



Фиг. 5

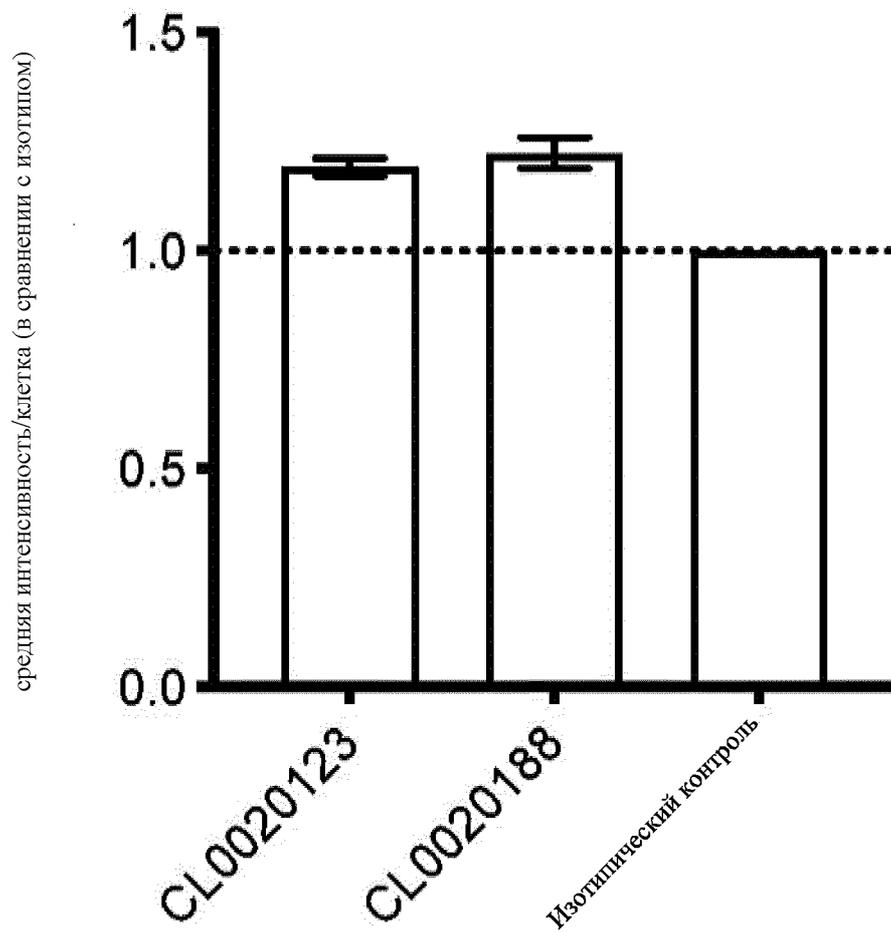


Фиг. 6

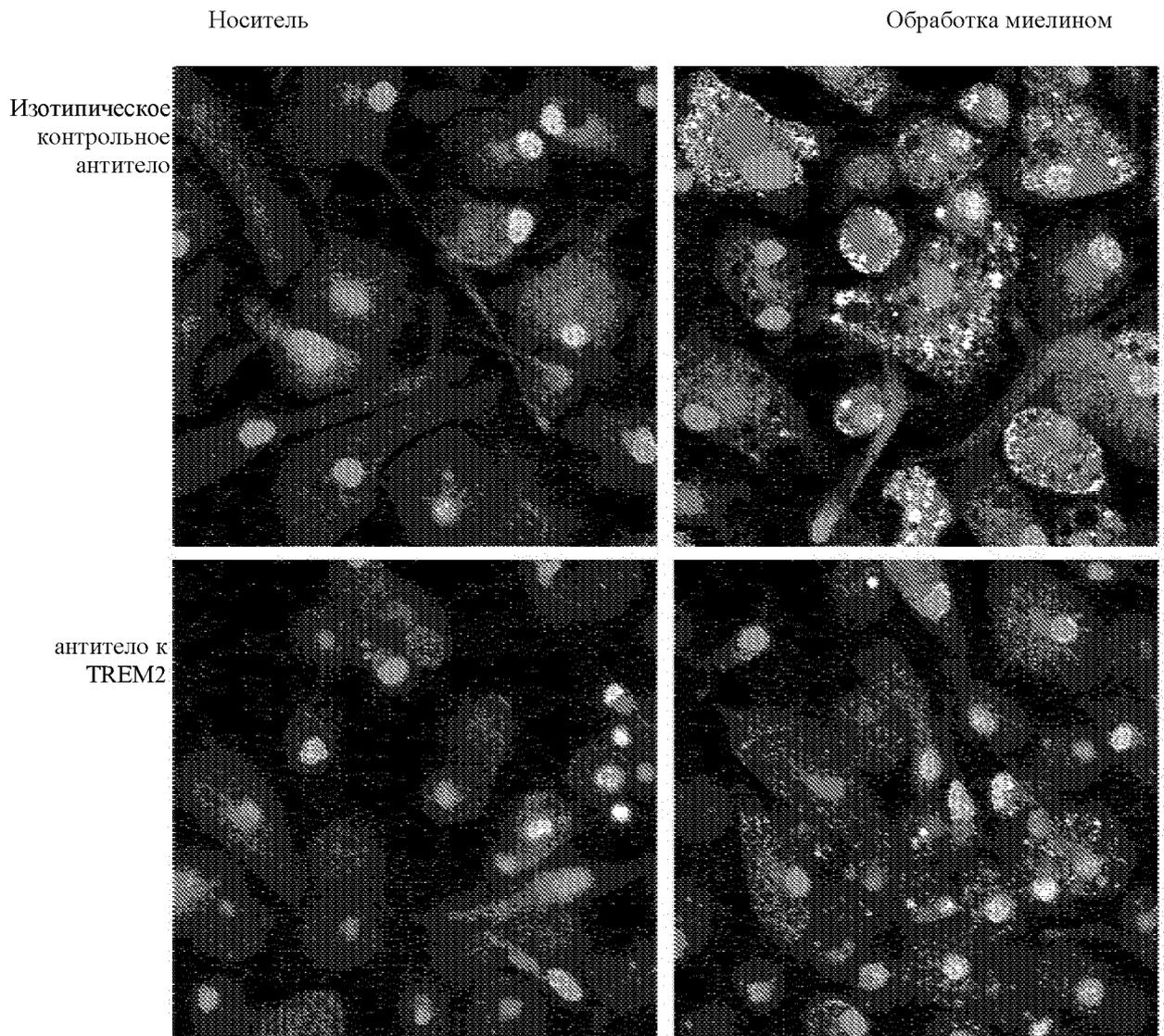


Фиг. 7

Фагоцитоз миелина – человеческий макрофаг 100 нМ антитела, 24ч, Среднее значение, СОС, n=2-10 биол. повторы

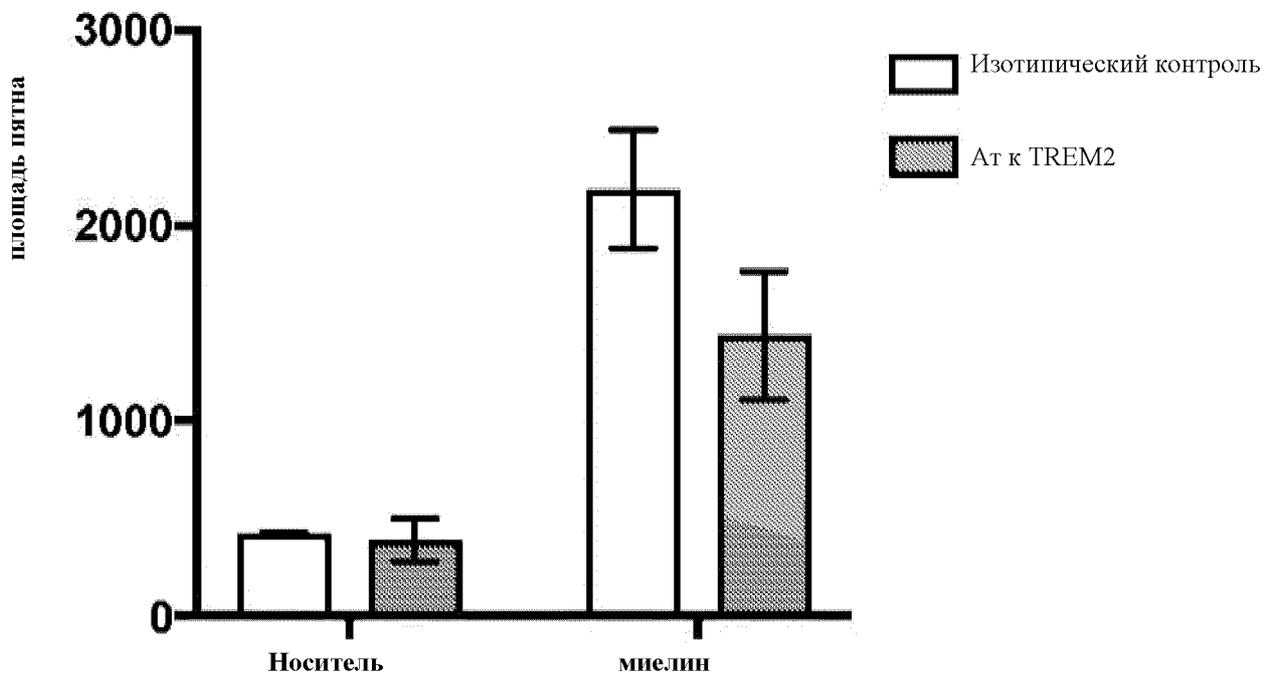


Фиг. 8А



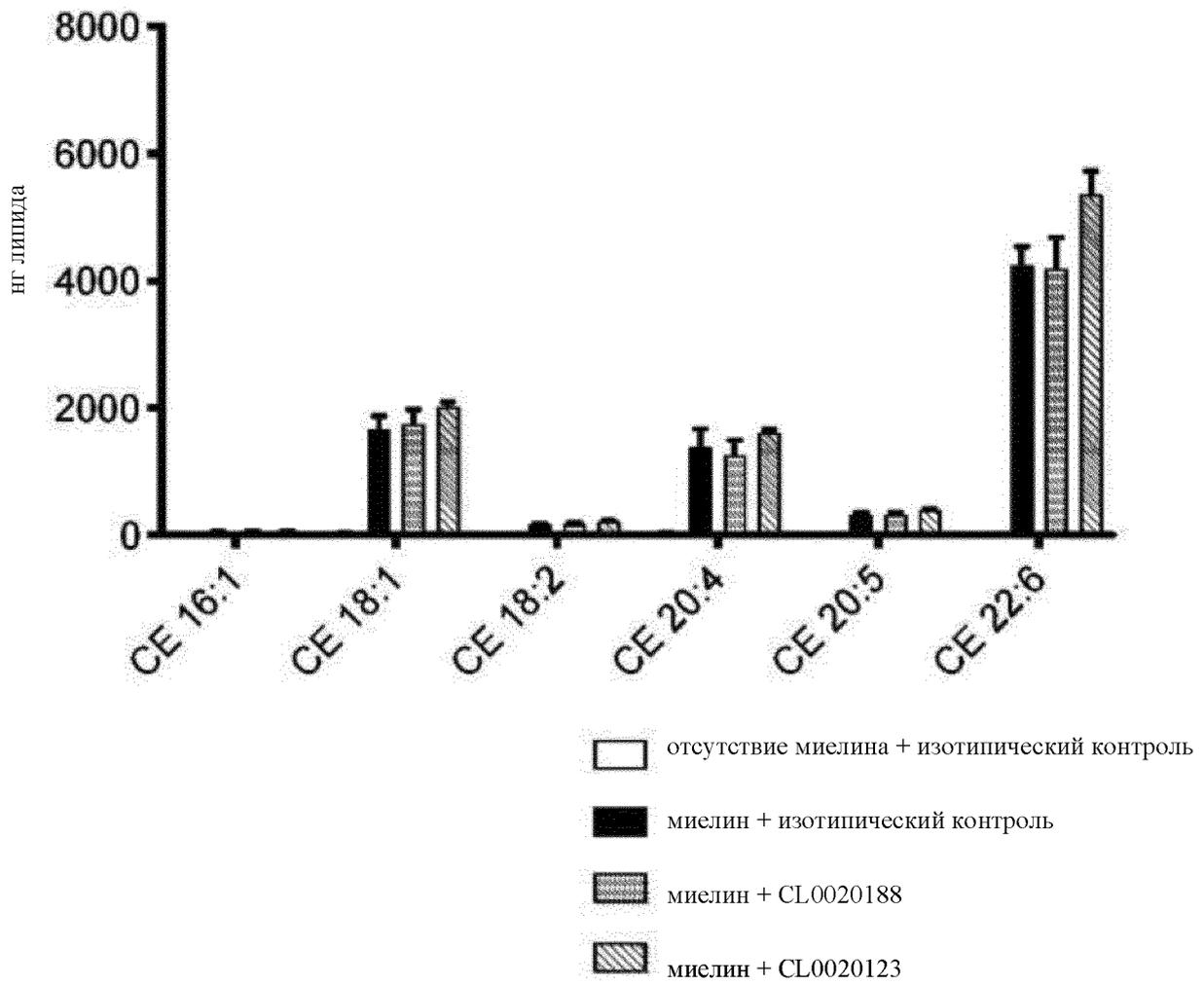
Фиг. 8В

## Окрашивание нильским красным

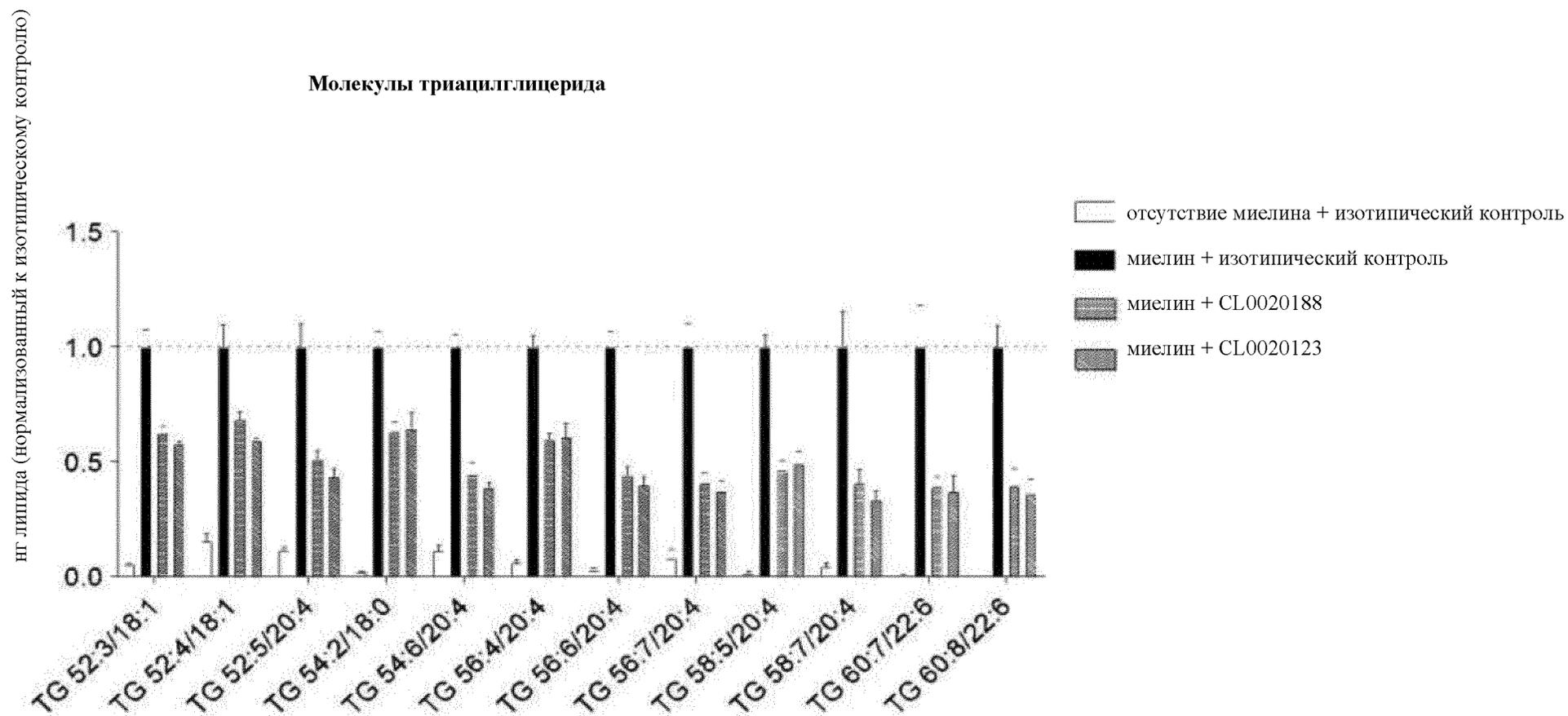


Фиг. 8С

## Молекулы холестерина эфира

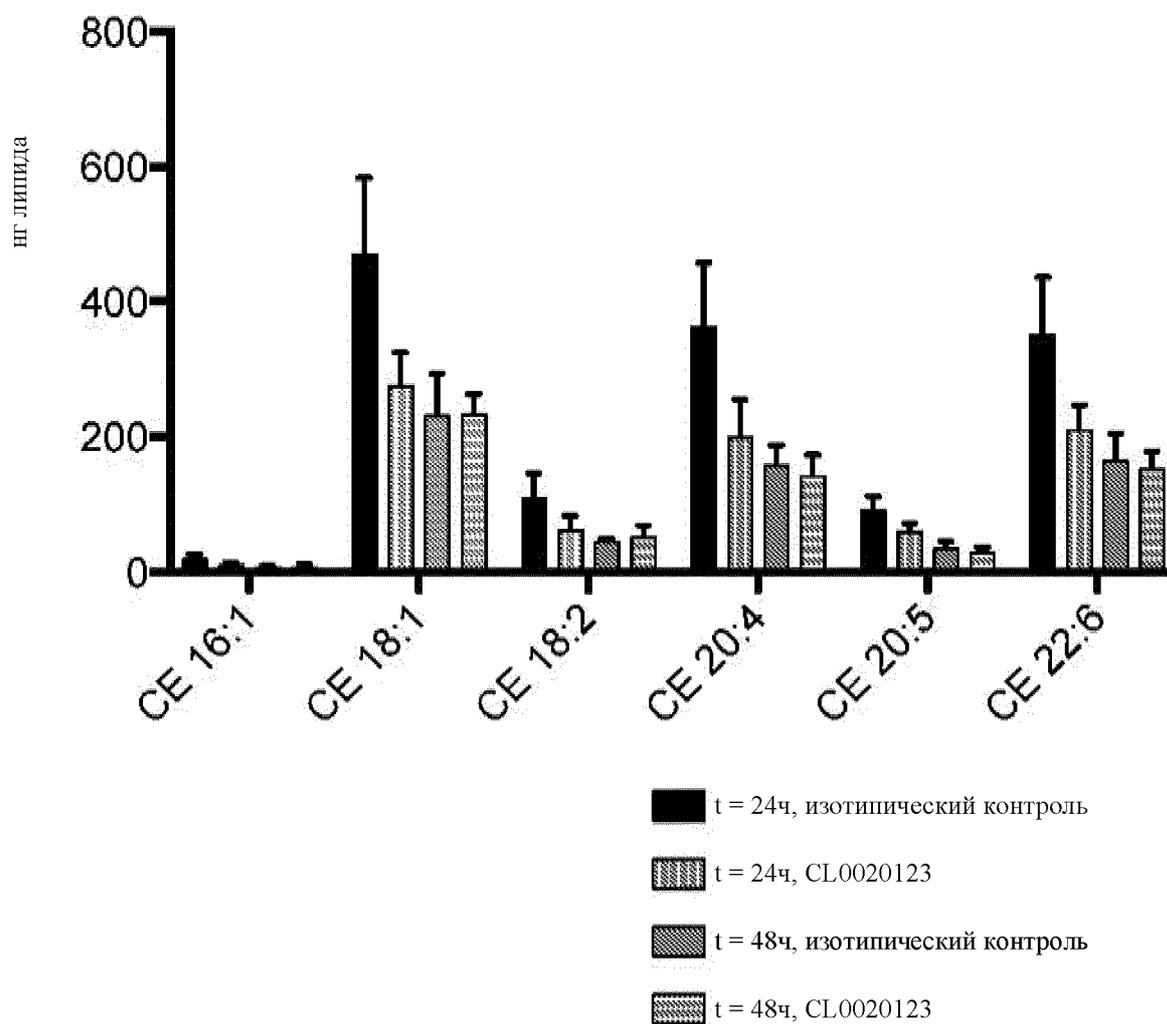


Фиг. 8D



Фиг. 8Е

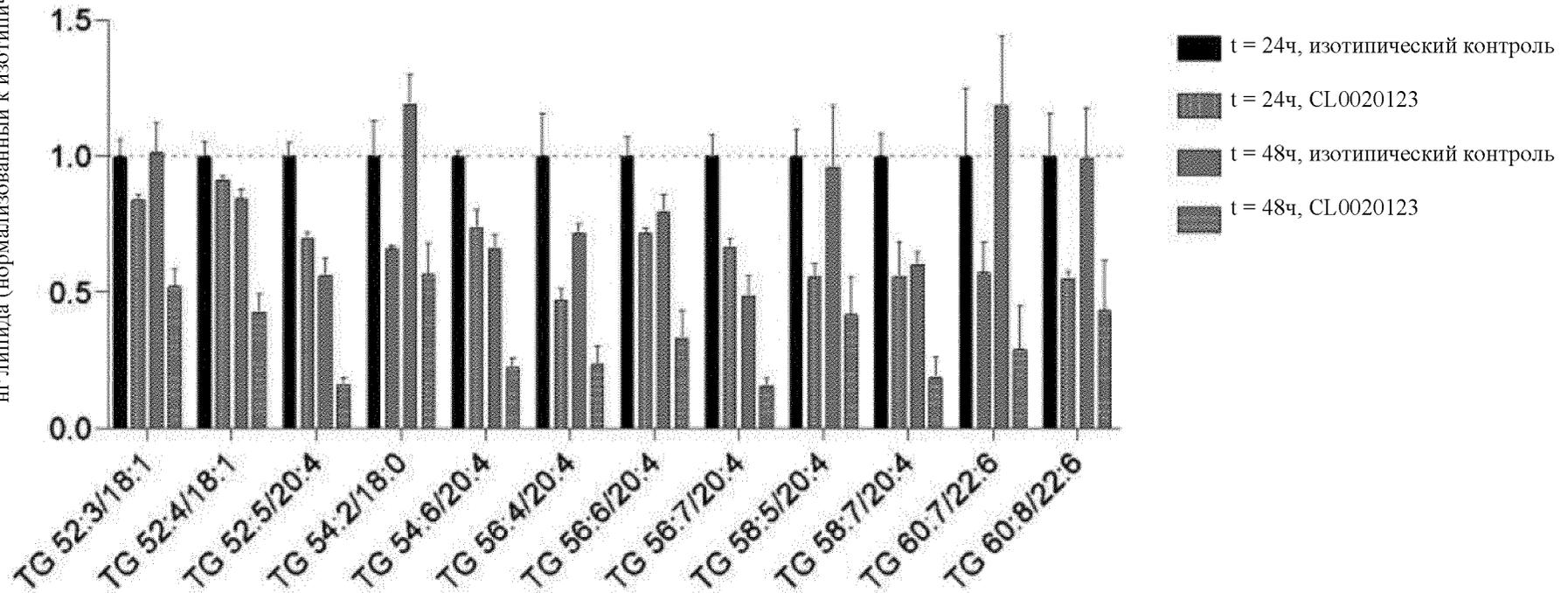
Молекулы холестерина эфира  
*вымывание миелина*



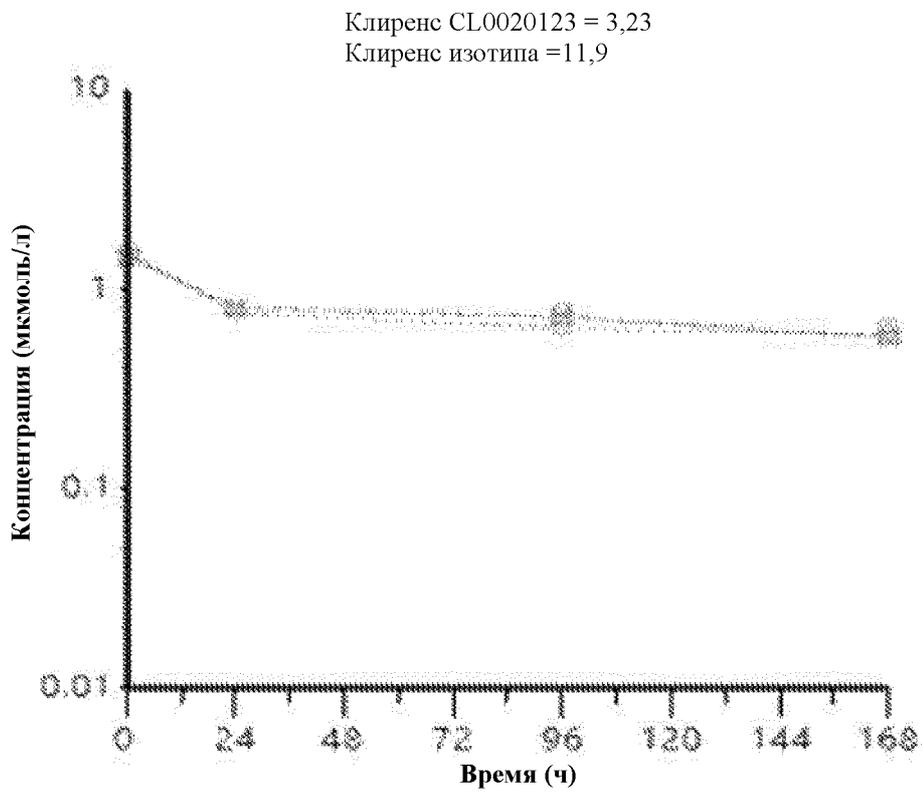
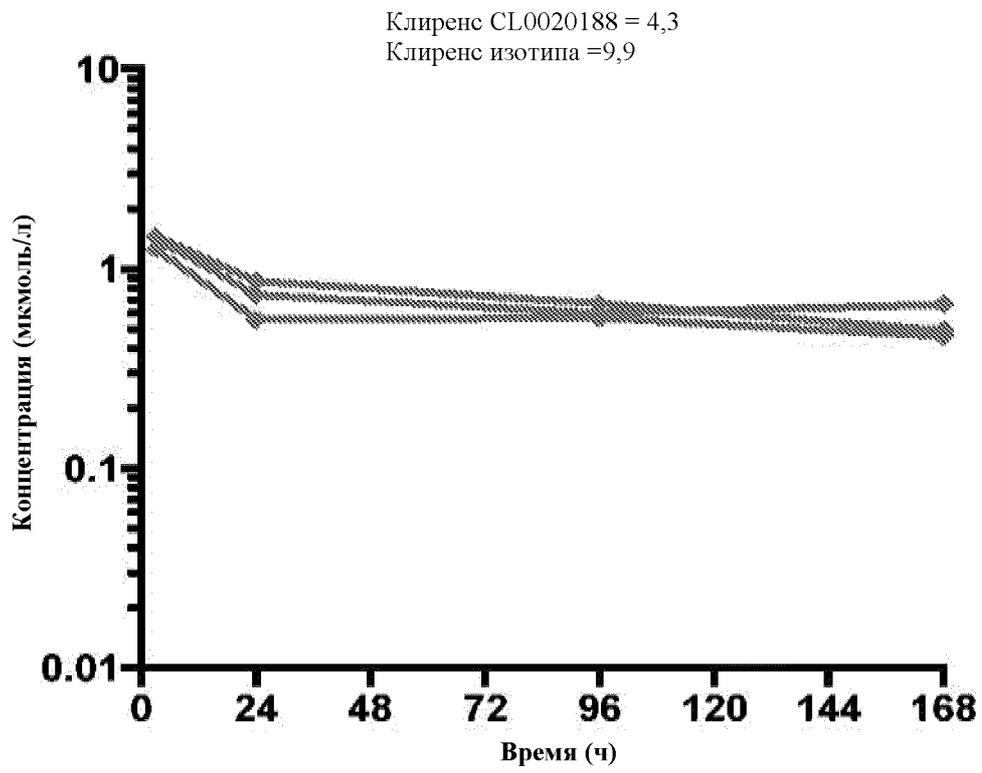
Фиг. 8F

нг липида (нормализованный к изотипическому контролю)

Молекулы триацилглицерида  
*вымывание миелина*

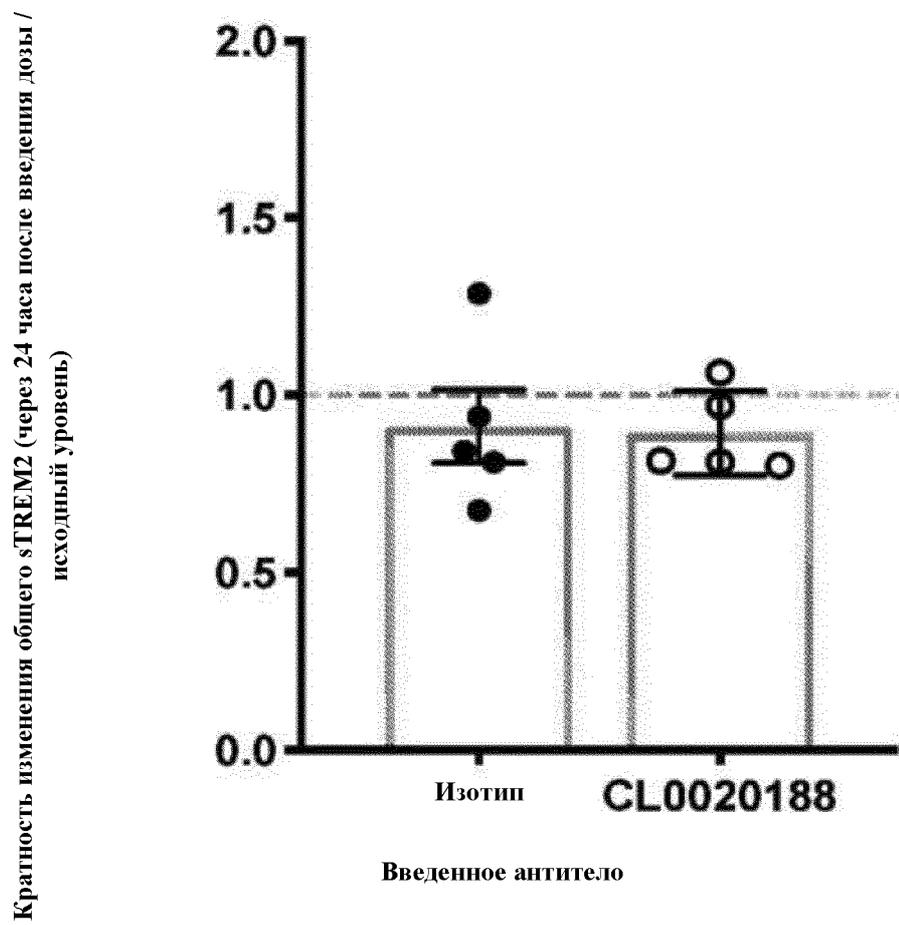


Фиг. 9



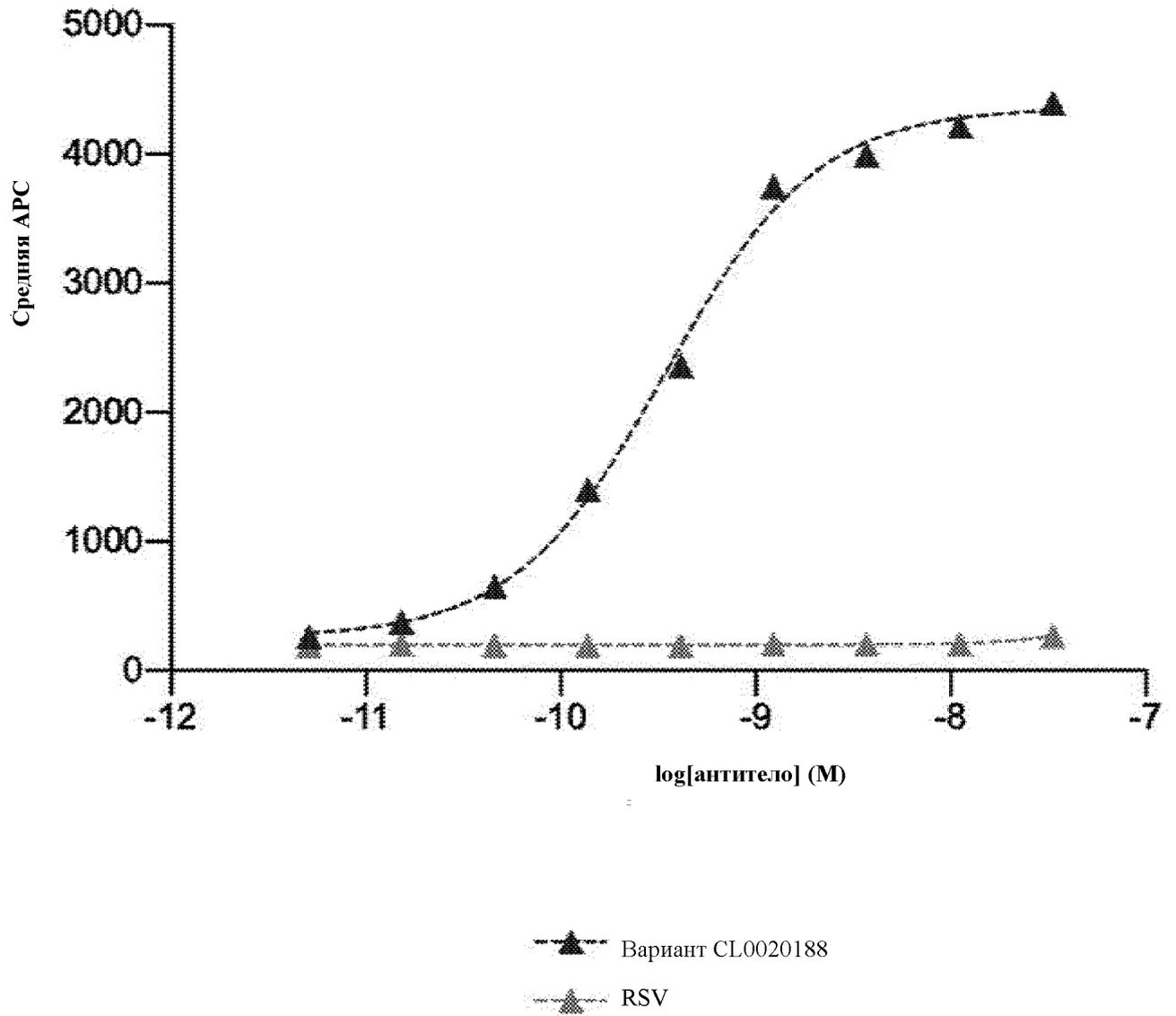
Фиг. 10А

Изменение общего sTREM2 в плазме у мышей с нокином hTREM2

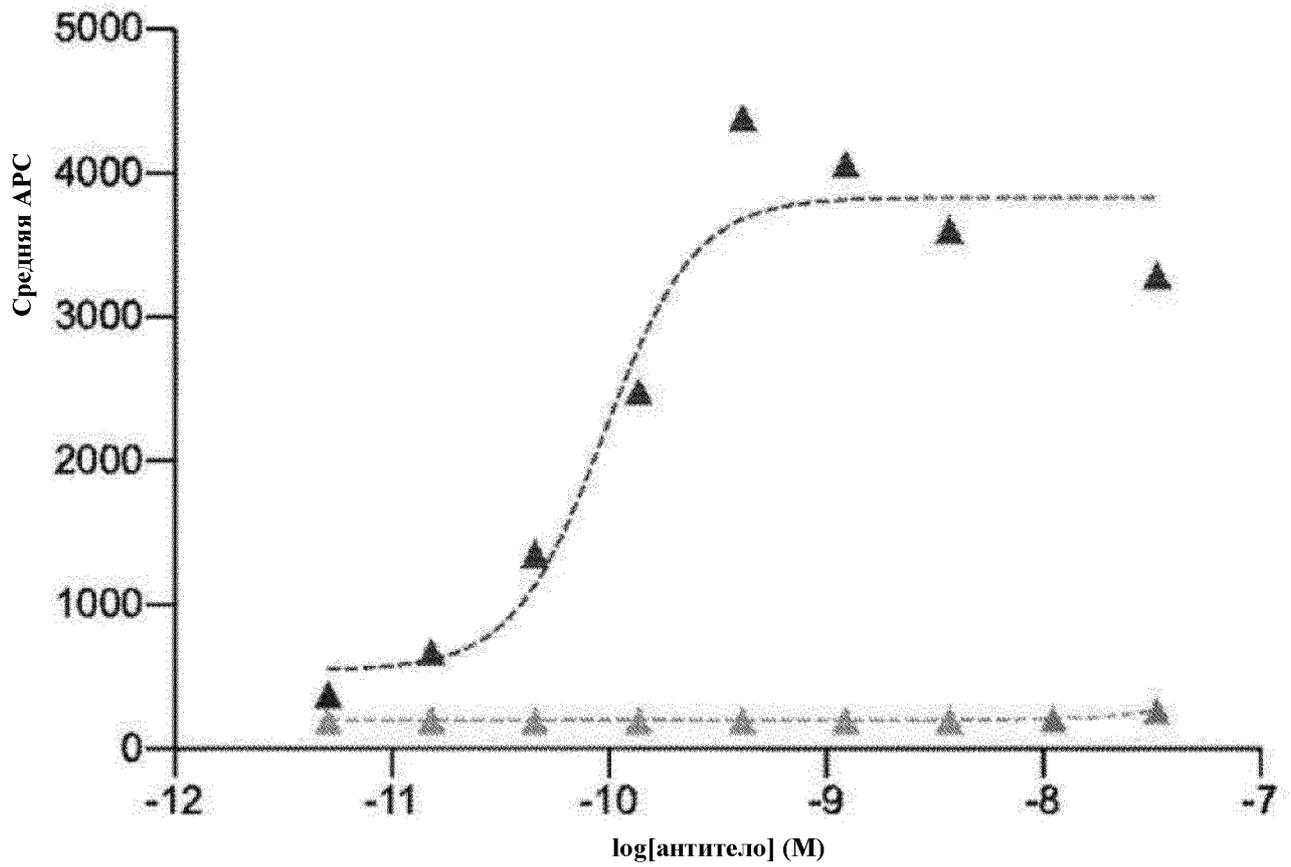




Фиг. 11А



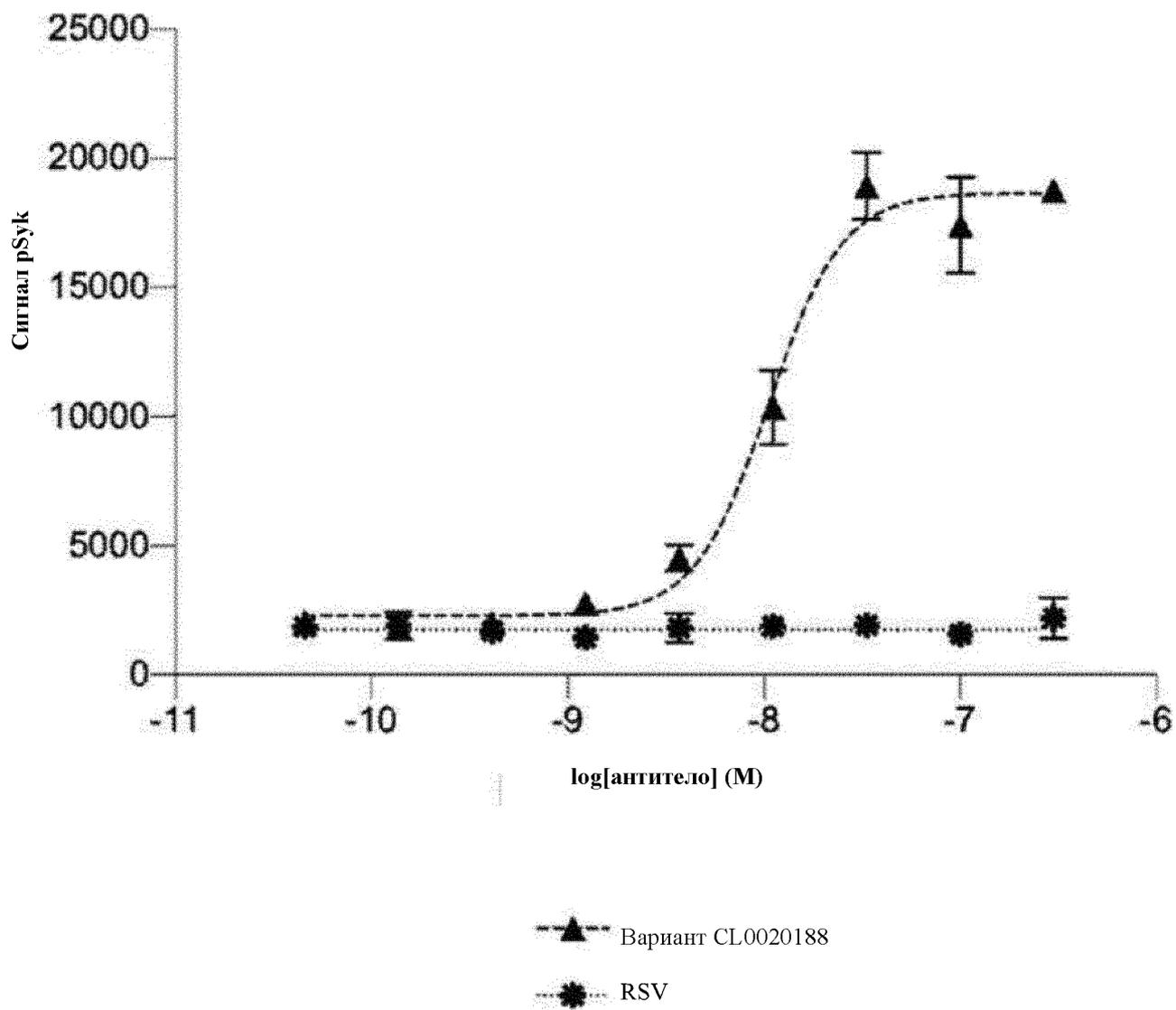
Фиг. 11В



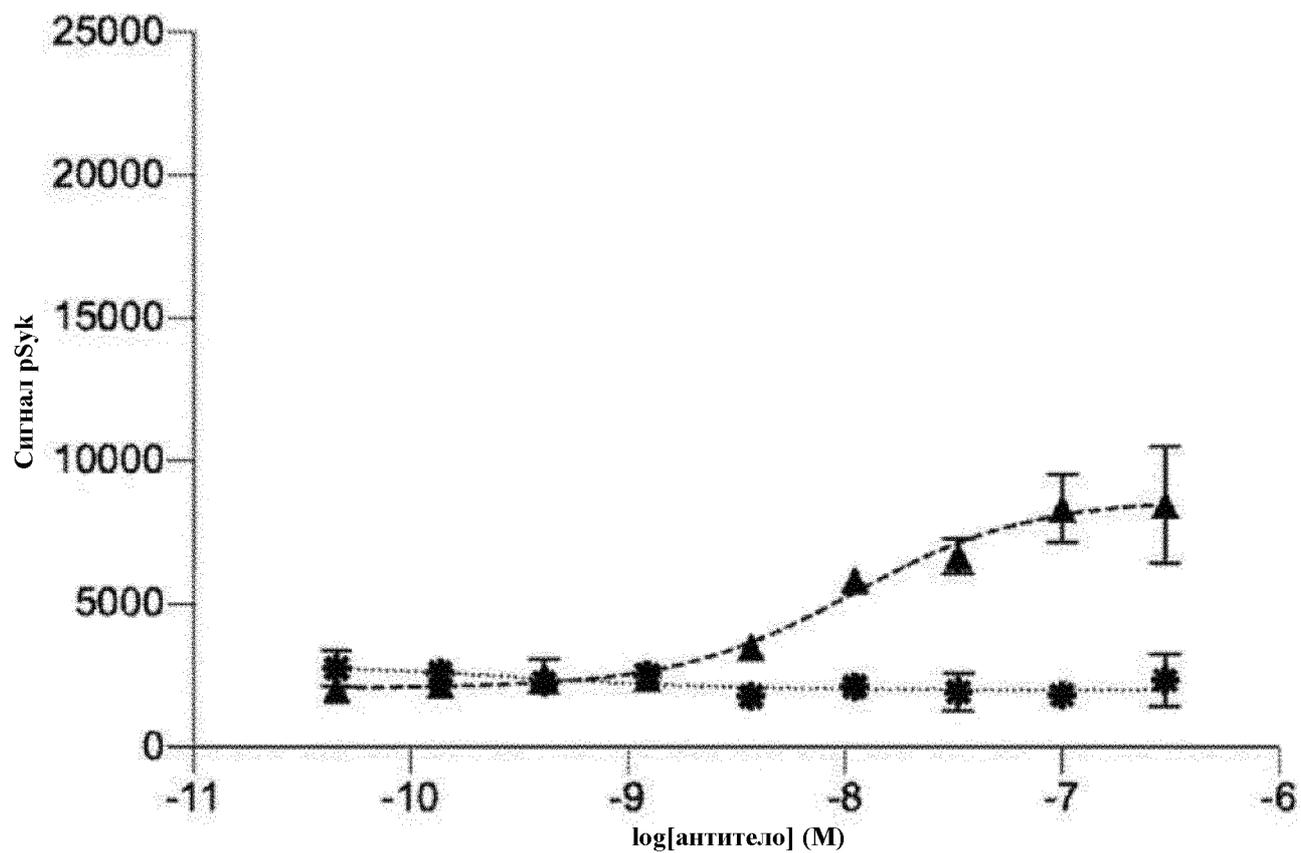
---▲--- Вариант CL0020123

.....▲..... RSV

Фиг. 12А



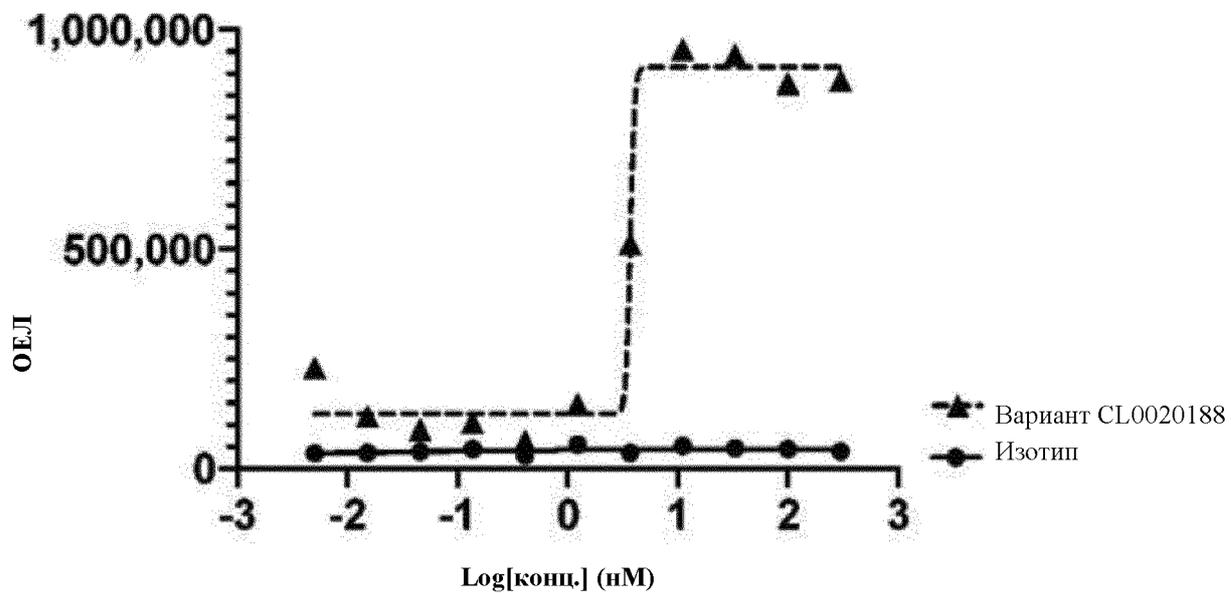
Фиг. 12В



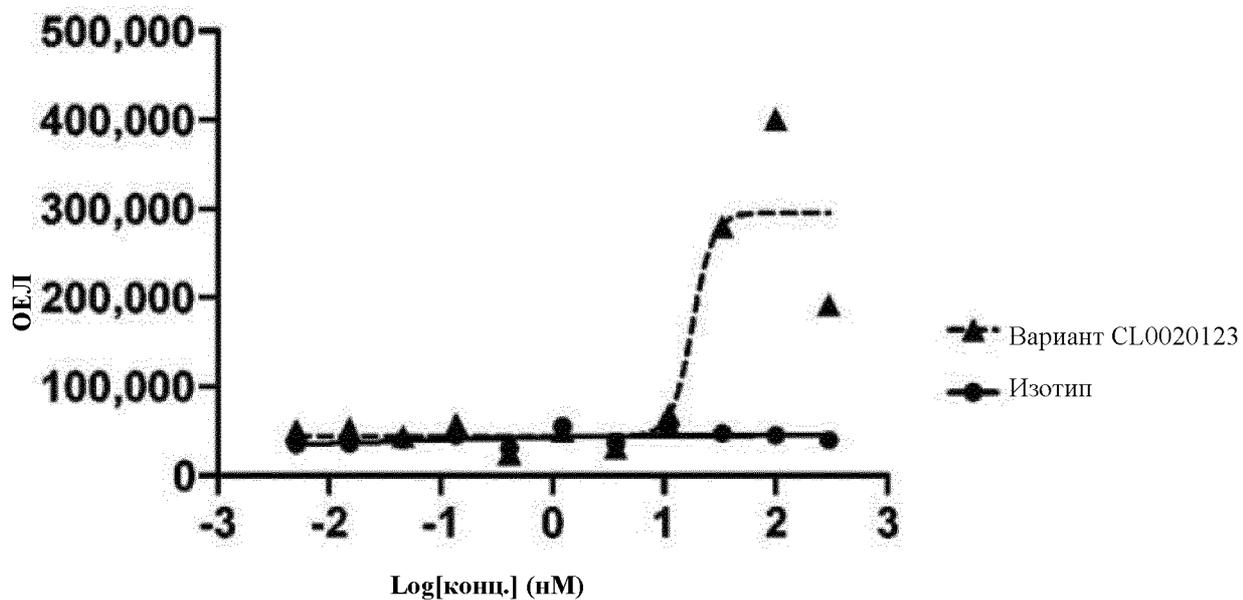
—▲— Вариант CL0020123  
—\*— RSV

Фиг. 13

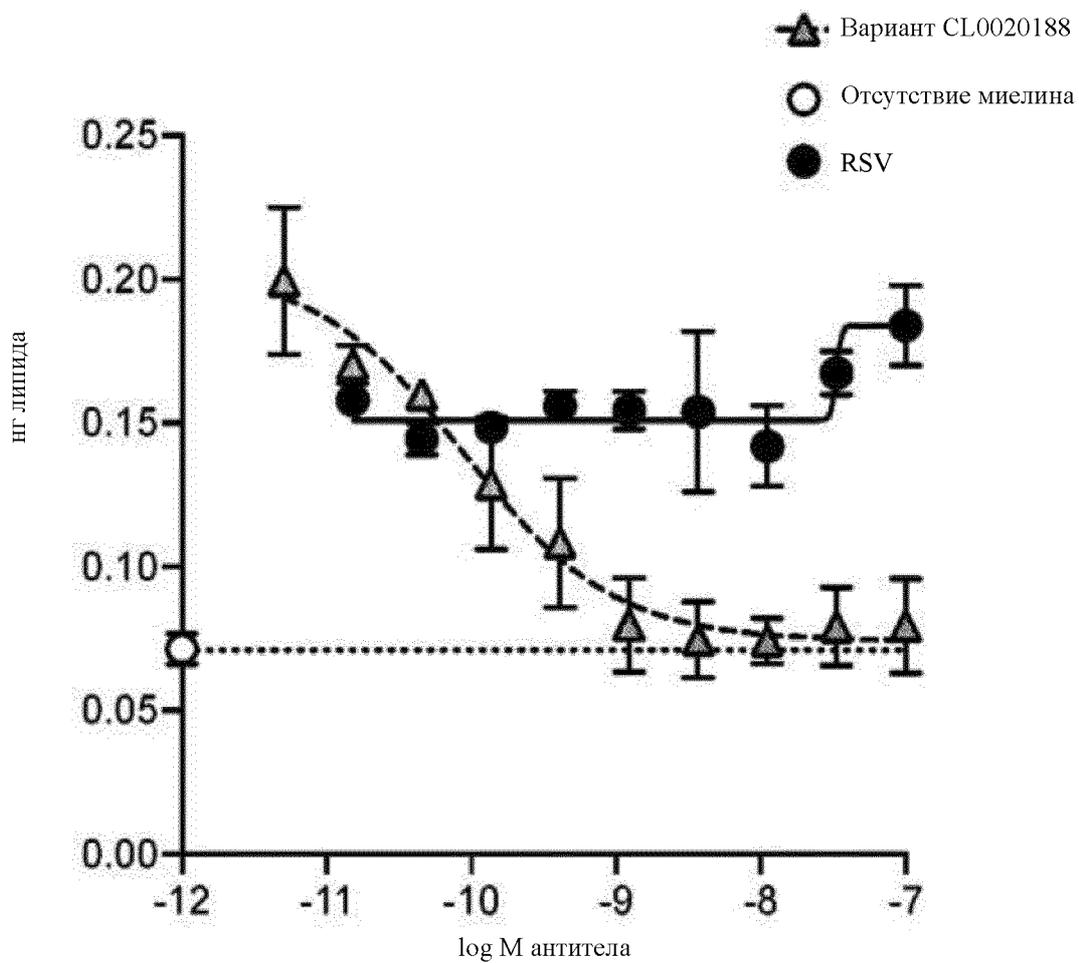
## Вариант CL0020188



## Вариант CL0020123



Фиг. 14А



Фиг. 14В

