

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291574 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.16

(54) АНТИТЕЛА К TREM2 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/939,097

(32) 2019.11.22

(33) US

(86) PCT/US2020/060663

(87) WO 2021/101823 2021.05.27

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Эндрюс Форест Хойт, Феллоус Росс
Эдвард, Тан Ин, Ван Ямин (US)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к антителам к TREM2 и вариантам их применения для лечения заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания.

202291574 A1

202291574

A1

АНТИТЕЛА К TREM2 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с TREM2, композициям, содержащим такие антитела к TREM2, и способам применения таких антител к TREM2 для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

Экспрессируемый на миелоидных клетках триггерный рецептор 2 (TREM2) представляет собой трансмембранный гликопротеин клеточной поверхности, который экспрессируется в миелоидных клетках, таких как дендритные клетки, гранулоциты и тканеспецифические макрофаги, такие как остеокласты, клетки Купфера и альвеолярные макрофаги. Трансмембранная область TREM2 связывается с адаптерными белками DAP12 и DAP10, и передача сигналов TREM2 посредством адаптерных белков приводит к активации последующих мишеней, таких как mTOR и MAPK. Таким образом, активация TREM2 приводит к таким видам активности как повышенная пролиферация, выживаемость, фагоцитоз, фагоцитарный окислительный взрыв с продукцией активных форм кислорода (АФК), а также экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов. После активации миелоидных клеток при определенных обстоятельствах связанный с мембраной TREM2 может отщепляться протеазами, что приводит к высвобождению растворимого TREM2.

TREM2 вовлечен в нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера. TREM2 экспрессируется микроглией в головном мозге, и повышенная экспрессия TREM2 наблюдается у пациентов с болезнью Альцгеймера и в моделях тау-патологии на мышах. Кроме того, мутации TREM2 связаны с нейродегенеративными заболеваниями, и было показано, что мыши, нокаутные по TREM2, защищены от возрастных воспалительных изменений, накопления окисленных липидов и потери нейрональных структур (см., например, Gerlach, et al., TREM2 triggers microglial density and age-related neuronal loss. *Glia*, 67(3):539-550 (2019)). Дефицит TREM2 также может оказывать нейропротекторное действие, уменьшая потери объема гиппокампа после черепно-мозговой травмы (см. Saber, et al., Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Deficiency Alters Acute Macrophage Distribution and Improves Recovery after Traumatic Brain Injury, *J. Neurotrauma*, 34:423-435 (2017)).

Антитела к TREM2 известны в данной области техники. Например, в РСТ публикации № WO 2016/023019 и РСТ публикации № WO 2019/028292 раскрыты антитела к TREM2. Такие антитела могут кластеризовать и активировать TREM2 *in vivo* и/или связывать TREM2 человека с наномолярной аффинностью.

Таким образом, все еще существует потребность в альтернативных антителах к TREM2, которые 1) связывают TREM2 человека с целевой высокой аффинностью и скоростями ассоциации и диссоциации для оптимальной активности, 2) уменьшают состояние активации микроглии и/или способствуют гомеостазу микроглии, не влияя на общее количество микроглии (например, отсутствует влияние на выживаемость), 3) ингибируют передачу сигналов TREM2, 4) обеспечивают эффективность *in vivo*, 5) демонстрируют низкий иммуногенный потенциал, и/или 6) демонстрируют подходящие характеристики возможности разработки, такие как стабильность, растворимость, низкая самоассоциация, и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или применения в лечении нейродегенеративных нарушений.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены новые антитела к TREM2, которые связывают TREM2 человека с высокой аффинностью. Считается, что антитела согласно настоящему изобретению обеспечивают средство, способствующее гомеостазу микроглии. Антитела согласно настоящему изобретению также обладают по меньшей мере одним из следующих свойств: уменьшают состояние активации микроглии и/или восстанавливают гомеостаз микроглии, не влияя на общее количество микроглии (например, не влияя на выживаемость), предотвращают макрофагальный фагоцитоз, ингибируют передачу сигналов TREM2, обеспечивают эффективность *in vivo*, демонстрируют низкий иммуногенный потенциал и/или демонстрируют подходящие характеристики возможности разработки для клинической разработки и/или применения в лечении нейродегенеративных нарушений.

Такие антитела могут применяться в лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, и могут быть терапевтически эффективными в более низких дозах или при менее частом дозировании.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает TREM2, содержащее переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), причем указанная LCVR содержит определяющие комплементарность или гиперпеременные участки (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и указанная HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2, и HCDR3, и при этом LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2, LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3, HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4, HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5, и HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

Согласно варианту реализации LCVR имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 7, и HCVR имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8. Согласно варианту реализации антитело содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем указанная LC имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и указанная HC имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10. Согласно варианту реализации антитело представляет собой человеческое антитело.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую HC антитела, причем указанная HC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую LC антитела, причем указанная LC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую HC и LC, причем указанная HC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, и указанная LC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую HC антитела, причем указанная HC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, и молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую LC антитела, причем указанная LC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую HC и LC, причем указанная HC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, и указанная LC содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении нейродегенеративного заболевания. Согласно варианту реализации нейродегенеративное

заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз (БАС) или лобно-височную деменцию. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении черепно-мозговой травмы.

5 Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, имеющего нейродегенеративное заболевание, включающий введение
указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему
изобретению. Согласно варианту реализации нейродегенеративное заболевание
представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич,
10 рассеянный склероз, БАС или лобно-височную деменцию. Согласно варианту реализации
настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, имеющего черепно-
мозговую травму, включающий введение указанному пациенту эффективного количества
антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения также предложено антитело
15 согласно настоящему изобретению для применения в терапии. Согласно варианту
реализации настоящего изобретения предложено антитело согласно настоящему
изобретению для применения в лечении нейродегенеративного заболевания. Согласно
варианту реализации нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь
Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС или
20 лобно-височную деменцию. Согласно варианту реализации настоящего изобретения
предложено антитело согласно настоящему изобретению для применения в лечении
черепно-мозговой травмы.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложено применение
антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для
25 лечения нейродегенеративного заболевания. Согласно варианту реализации
нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера,
прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС или лобно-височную
деменцию. Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложено
применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного
30 средства для лечения черепно-мозговой травмы.

«Антитело к TREM2» относится к антителу, которое связывает TREM2 (включая
варианты TREM2, такие как вариант R47H) и при введении *in vitro* или *in vivo* приводит по
меньшей мере к одному желаемому виду активности, такому как сниженное количество
активированной микроглии.

В настоящем документе термин «антитело» в контексте настоящего изобретения относится к сконструированному, не встречающемуся в природе полипептидному комплексу, имеющему две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), так, что тяжелые цепи и легкие цепи связаны между собой дисульфидными связями, причем указанное антитело представляет собой антитело изотипа IgG. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из N-концевой LCVR и константной области легкой цепи. При экспрессии в определенных биологических системах антитела гликозилированы в области Fc. Как правило, гликозилирование происходит в области Fc антитела в высококонсервативном участке N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела также могут быть гликозилированы в других положениях.

Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, который является частью антитела, которая связывает антиген (антигены). CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится на карбоксиконце тяжелой цепи. Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; при этом CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab.

Области HCVR и LCVR антитела согласно настоящему изобретению могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками («CDR»), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками («FR»). Каждая LCVR и HCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В настоящем документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые обеспечивают специфичные взаимодействия с антигеном. Определение CDR по Kabat (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)) основано на вариабельности последовательности антител. Определение CDR по Chothia (Chothia, et al., «Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins», Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani, et al., «Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins», Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) основано на трехмерных структурах антител и топологиях CDR-петель. Определения CDR по Chothia идентичны определениям CDR по Kabat, за исключением HCDR1 и HCDR2.

Определение CDR по North (North, et al., «A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations», Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) основано на кластеризации распространения близости («affinity propagation») с большим количеством кристаллических структур. Для целей настоящего изобретения отнесение аминокислот к доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител согласно настоящему изобретению основано на хорошо известном соглашении по нумерации Kabat.

Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой гуманизированные или человеческие антитела. Предпочтительно антитела представляют собой человеческие антитела. В контексте моноклональных антител термины «человеческий» (или «полностью человеческий») и «гуманизированный» хорошо известны обычным специалистам в данной области техники (Weiner, L.J., J. Immunother. 2006; 29: 1-9; Mallbris L, et al., J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13-15). Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой антитела IgG4PAA. Антитело IgG4PAA представляет собой антитело IgG4, имеющее замену серина пролином и две замены лейцина аланином в положениях (в соответствии с нумерацией ЕС) 228, 234, 235, соответственно (т.е. S228P, F234A, L235A).

Молекула ДНК согласно настоящему изобретению представляет собой молекулу ДНК, которая содержит не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из полипептидов в антителе согласно настоящему изобретению (например, тяжелой цепи, легкой цепи, вариабельной тяжелой цепи или вариабельной легкой цепи).

Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR, может быть преобразована в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей HCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенная ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа

или лямбда. Предпочтительно для антител согласно настоящему изобретению константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность детектирования тех клеток, которые трансформированы целевыми последовательностями ДНК.

Антитела согласно настоящему изобретению можно легко получить в клетках млекопитающих, неограничивающие примеры которых включают клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева культивируют с использованием методик, хорошо известных в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Различные способы очистки белка могут применяться для очистки белков, включая антитела, но не ограничиваясь ими, при этом такие способы известны в данной области техники.

Антитело согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить парентеральными путями, неограничивающими примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело согласно настоящему изобретению может быть введено пациенту совместно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно приготовить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), Loyd, A., et al., Pharmaceutical Press), и содержат антитело, как раскрыто в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

Термин «процесс лечения» (или «лечить», или «лечение») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению

вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, состояния или заболевания.

«Эффективное количество» означает такое количество антитела к TREM2 согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, которое будет вызывать биологический или клинический ответ ткани, системы, организма животного, млекопитающего или человека, или оказывать целевое терапевтическое действие на них, которое предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, и способности антитела вызывать целевой ответ у индивидуума. Такое благоприятное действие включает, и не ограничивается этим, уменьшение активации микроглии и возможность замедления атрофии головного мозга или потери когнитивных функций. Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники, используя известные методики и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента лечащий врач-диагност учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: конституцию пациента, возраст и общее состояние здоровья, конкретное вовлеченное заболевание или нарушение, степень или вовлечение в патологический процесс, или тяжесть заболевания или нарушения, ответ конкретного пациента, конкретное вводимое соединение, способ введения, характеристики биодоступности вводимого препарата, выбранную схему дозирования, применение сопутствующих лекарственных средств, и другие значимые обстоятельства.

Конструирование антитела

Для получения антител согласно настоящему изобретению было выполнено существенное конструирование, включая конструирование антитела на уровне зародышевой линии, созревание аффинности, деиммунизацию и оптимизацию способности соединения применяться коммерчески в качестве лекарственного средства. Такие антитела представляют собой человеческие антитела, которые обладают высокой аффинностью в отношении TREM2 человека, сниженной иммуногенностью и приемлемой или оптимальной возможностью разработки для клинических исследований с участием людей.

Например, конструирование выполняли в мотиве DSD тяжелой цепи (остатки D54, S55 и D56) для уменьшения изомеризации в D54 и/или D56. Серин в положении 55 был мутирован либо в глутамин (S55Q), либо в гистидин (S55H). Обе мутации нейтральны в отношении аффинности антитела. Мутация S55Q неожиданно привела к значительному

снижению изомеризации с 5,1% до 1%, в то время как мутация S55H увеличила изомеризацию до 63%. Таким образом, мутация тяжелой цепи S55Q уменьшает изомеризацию при одновременном сохранении аффинности связывания.

ПРИМЕРЫ

5 **Пример: экспрессия и очистка антител**

Антитела к TREM2 согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы и очищены по существу так, как описано далее. Соответствующую клетку-хозяина, такую как НЕК 293 или CHO, можно временно или стабильно трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимальное, предварительно определенное
10 соотношение векторов HC:LC (такое как 1:3 или 1:2) или одновекторную систему, кодирующую как HC, так и LC. Осветленные среды, в которые происходила секреция антитела, могут быть очищены с использованием любой из многих обычно применяемых методик. Например, в случае фрагмента Fab среда может быть нанесена на колонку MabSelect® (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную
15 совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов.

Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом pH (например, от 20 mM Трис-буфера, pH 7,0, до 10 mM цитратного натриевого буфера, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, до 100 mM глицинового буфера, pH 3,0). Фракции
20 антитела могут быть детектированы, например, с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а затем могут быть объединены. Дальнейшая очистка является необязательной, в зависимости от предполагаемого применения. Антитело можно концентрировать и/или стерильно фильтровать, используя обычные методики. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью обычных методик, включая
25 эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Чистота антитела после этих этапов хроматографии составляет от приблизительно 95% до приблизительно 99%.

Продукт может храниться в холодильнике, может быть немедленно заморожен при -70°C или может быть лиофилизирован. SEQ ID NO аминокислотных последовательностей
30 для примерных человеческих антител согласно настоящему изобретению показаны ниже в Таблице

Таблица 1. Аминокислотные последовательности антитела к TREM2 1.

LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6

LCVR	HCVR	LC	HC
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

5 **Пример: кинетика связывания и аффинность антитела 1 в отношении TREM2**

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) при 37°C используется для определения кинетики связывания и аффинности в отношении антигена антител к TREM2, антитела 1, референсного антитела А или референсного антитела В. Референсное антитело А содержит HCVR, представленную SEQ ID NO: 11, 13, 15, 16, 132, 135, 126, и LCVR, представленную SEQ ID NO: 20, 22, 23, 25, 144, 131 и 129, в РСТ публикации № WO2019/028292. Референсное антитело В содержит HCVR и LCVR, представленные SEQ ID NO: 412 и 413, соответственно, в РСТ публикации № WO2016/023019.

Кинетику связывания и аффинность антител к TREM2 в отношении слитых с С-концевой His-меткой внеклеточных доменов (ВКД) TREM2 человека (SEQ ID NO: 11), мыши (SEQ ID NO: 12), крысы (SEQ ID NO: 14), кролика (SEQ ID NO: 13) или яванской макаки (SEQ ID NO: 15) определяют с использованием биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса, такого как BIAcore® T100, BIAcore® T200 или BIAcore® 8K (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси, США).

Образцы растворяют в 1х рабочем буфере HBS-EP+ (Teknova) и для захвата антитела используют сенсорный чип CM5 серии S, связанный с белком А (GE Healthcare). Связывание оценивают с использованием нескольких аналитических циклов. Каждый цикл выполняют при 37°C при скорости потока 50 мкл/мин для захвата антитела и 30 мкл/мин - для ассоциации и диссоциации лиганда. Каждый цикл состоит из следующих этапов: впрыскивание 7 мкл 1 мкг/мл антитела для захвата 150-250 единиц ответа, впрыскивание TREM2-His ВКД человека, яванской макаки, кролика, крысы или мыши (начиная с 20 нМ и с использованием двукратных последовательных разведений для каждого цикла), затем 200 секунд для ассоциации с последующей 800-секундной фазой диссоциации, и регенерация с использованием 10 мМ гидрохлорида глицина, pH 1,5, в течение 30-секундного времени контакта. Скорости ассоциации (т.е. k_{on}) и диссоциации (т.е. k_{off}) для каждого цикла оценивают с использованием двух референсных значений

стандартов и аппроксимируют к модели «связывания 1:1 (Ленгмюра)» при оценке Biacore 8K в режиме пакетной обработки данных параллельной кинетики. Аффинность (K_D) рассчитывают на основании кинетики связывания в соответствии с соотношением $K_D = K_{off}/K_{on}$. На основании данных о двухфазном связывании референсного антитела А для

5 расчета K_D использовали моделирование связывания гетерогенного лиганда 2:1, обнаруженное при оценке Biacore 8K. Гетерогенный лиганд 2:1 дает 2 значения k_{on} и 2 значения k_{off} для расчета значения K_D . $N=3$ для антитела 1 и референсного антитела А и $n=1$ для референсного антитела В.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, получили следующие данные:

Таблица 2. Кинетика связывания и аффинность (среднее $\pm$ стандартное отклонение).

TREM2 человека	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Антитело 1	$3,4 \pm 0,1 \times 10^6$	$5,8 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$0,17 \pm 0,01$
Референсное антитело В	$4,9 \pm 0,5 \times 10^5$	$5,2 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$9,8 \pm 0,1$
Референсное антитело А*	$7,0 \times 10^6$ $2,1 \times 10^3$	0,12 $5,9 \times 10^{-4}$	3,69
TREM2 яванской макаки	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Антитело 1	$5,0 \times 10^6$	$3,7 \times 10^{-4}$	0,075
Референсное антитело В	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
Референсное антитело А*	$1,1 \times 10^7$ $3,1 \times 10^3$	0,078 $6,5 \times 10^{-4}$	1,2
TREM2 мыши	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Антитело 1	$2,5 \pm 0,1 \times 10^7$	$4,4 \pm 0,5 \times 10^{-2}$	$1,6 \pm 0,2$
Референсное антитело В	$1,3 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,9 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$2,1 \pm 0,1$
Референсное антитело А	НО [#]	НО [#]	НО [#]
TREM2 R47H человека	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Антитело 1	$5,0 \times 10^6$	$3,7 \times 10^{-4}$	0,075
TREM2 крысы	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
Антитело 1	НО [#]	НО [#]	НО [#]
Референсное антитело В	$2,8 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$0,73 \pm 0,03$
Референсное антитело А	НО [#]	НО [#]	НО [#]

5 *Связывание является двухфазным, и данные соответствуют модели связывания гетерогенного лиганда, что приводит к получению двух значений скорости прямой реакции (k_{on}) и скорости обратной реакции (k_{off}).

[#]При 200 нМ TREM2 не обнаружено связывания выше фона.

Эти данные демонстрируют, что антитело 1 связывало TREM2 человека и TREM2 яванской макаки с высокой аффинностью (пМ). Антитело 1 также связывало TREM2 мыши с аффинностью в диапазоне нМ и не связывало TREM2 крысы. Антитело 1 связывало TREM2 человека с более высокой аффинностью по сравнению с референсным антителом А и референсным антителом В, и антитело 1 также связывало TREM2 яванской макаки с более высокой аффинностью по сравнению с референсным антителом А. Ни для одного из протестированных антител не было обнаружено связывания с TREM2 кролика.

Сходные эксперименты выполняли при 25°C и получили следующие данные. Антитело 1 связывало TREM человека, мыши и яванской макаки, а также мутант R47H TREM человека с аффинностью связывания 150 пМ, 3,9 нМ, 43 пМ и 290 пМ, соответственно. Мутант R47H связан с развитием болезни Альцгеймера. Эти данные демонстрируют, что антитело 1 способно связывать R47H TREM.

Пример: связывание антитела 1 с клетками, экспрессирующими TREM2

Чтобы изучить, связывается ли антитело 1 с клетками, экспрессирующими TREM2, выполняют эксперимент по связыванию. Клеточную линию BW5147.G.1.4 трансдуцируют для экспрессии ДНК TREM2 человека и его адаптера, адаптерного белка 12 (DAP12). Для оценки связывания 500000 клеток инкубируют в присутствии антитела 1 с 3-кратным титрованием по 12 точкам, начиная с 30 мкг/мл, в течение 30 минут при 37°C. Связывание антитела детектируют с использованием Alexa Fluor 647-конъюгированного козьего IgG к белку человека (Jackson Labs). Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) измеряют с использованием проточного цитометра Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Следуя методикам по существу так, как описано выше, показали, что антитело 1 связывалось с TREM2-экспрессирующими клетками BW5147.G.1.4 с ЭК₅₀ 0,08 мкг/мл. Эти данные продемонстрировали, что антитело 1 связывается с TREM2, связанным с клеточной мембраной.

Пример: ингибирование передачи сигналов TREM2

Чтобы изучить влияние опосредуемой антителами к TREM2 активации NFAT в присутствии лиганда, в качестве лиганда TREM2 используют фосфатидилсерин (PS, Avanti lipids). 96-луночный планшет, содержащий 1,5 мМ PS на лунку, высушивают при комнатной температуре в течение трех часов. Клетки BW5147.G.14 TREM2 NFAT с репортером люциферазой (400000 клеток на лунку) высевает на покрытые PS планшеты в присутствии изотипического контрольного антитела или антитела 1 с 5-кратным титрованием по 8 точкам, начиная с 30 мкг/мл. После 18-часовой инкубации при 37°C люминесценцию детектируют с использованием набора для экспресс-анализа люциферазы

светлячка от Pierce (Thermo Fisher) и считывающего устройства для планшетов Envision 2105 (Perkin Elmer).

В эксперименте, выполненном по существу так, как описано выше, антитело 1 ингибировало PS-опосредуемую активацию NFAT зависимым от концентрации образом с ИК₅₀ 0,40 мкг/мл. Контрольное антитело не ингибировало PS-опосредуемую активацию NFAT. Эти данные демонстрируют, что антитело 1 может ингибировать запускаемую лигандом передачу сигналов TREM2.

Пример: ингибирование активации TREM2 в макрофагах

Чтобы изучить влияние антитела 1 на активацию TREM2 в макрофагах, макрофаги культивируют поверх среза ткани головного мозга PDAPP (который содержит физиологические эндогенные лиганды TREM2) в присутствии или в отсутствие антитела 1 или контрольного изотипического антитела.

Макрофаги, происходящие из костного мозга, получают путем культивирования клеток костного мозга в течение 5 дней в присутствии 50 нг/мл КСФ-1 (PEPROTECH). Чтобы индуцировать активацию TREM2, 400000 макрофагов высевают на срез ткани головного мозга мышей, трансгенных по предшественнику амилоида PDAPP, на три дня в присутствии 3 мкг/мл или 12 мкг/мл контрольного антитела или антитела 1. Уровни остеопонтина, непосредственного продукта активации TREM2, измеряют в супернатанте с использованием набора для ИФА (R&D Systems).

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получили следующие данные.

Таблица 3. Уровень макрофагального остеопонтина (пг/мл) в присутствии или в отсутствие антитела 1.

	Макрофаг	Макрофаг + головной мозг с PDAPP	Головной мозг с PDAPP
Без антитела (контроль)	38652±2033	127475±4863	7±3

	Макрофаг + головной мозг с PDAPP	
	3 мкг/мл антитела	12 мкг/мл антитела
Контрольное антитело	125141±30602	109078±37666
Антитело 1	57803±5706	38834±16348

Эти данные демонстрируют, что 3 мкг/мл и 12 мкг/мл антитела 1 ингибировали продукцию остеопонтина. Эти результаты показывают, что антитело 1 ингибирует активацию TREM2 в ответ на физиологические лиганды.

Пример: влияние антитела 1 на состояние активации микроглии во время тау-опосредуемой нейродегенерации *in vivo*

Чтобы оценить влияние антитела 1 на состояние активации микроглии во время тау-опосредуемой нейродегенерации *in vivo*, антитело 1 вводят семимесячным самкам мышей rTg4510 P301L, трансгенным по тау, в день ноль с 3-кратным титрованием по 6 точек, начиная с 300 мг на грамм массы тела. На день семь мышей умерщвляют и собирают ткань головного мозга для анализа РНК. *Clec7a*, TREM2-зависимый ген, измеряют в гиппокампе с использованием анализа кПЦР TaqMan, и относительную экспрессию нормируют к экспрессии гена домашнего хозяйства *Hprt*.

Следуя методикам по существу так, как описано выше, получили следующие данные.

Таблица 4. Относительная экспрессия *Clec7a* после обработки антителом 1 (+/- СОС)

Антитело 1 (мг/кг)	300	100	30	10	3	1
Относительная экспрессия <i>Clec7a</i>	9,9±1,0	13,4±4,0	13,8±1,0	19±2,0	16±2,0	18±1,0

Эти данные демонстрируют зависимое от концентрации антитела снижение уровня *Clec7a* в гиппокампе после обработки антителом 1 и указывают на то, что антитело 1 ингибирует TREM2 *in vivo*. Также определяли уровни растворимого TREM2 и наблюдали дозозависимое повышение уровня растворимого TREM2 в СМЖ.

Пример: протеомика пептида, связанного с главным комплексом гистосовместимости

Чтобы изучить иммуногенный потенциал антитела 1 выполняли анализ протеомики пептида, связанного с главным комплексом гистосовместимости (МАРР). Первичные дендритные клетки человека от десяти нормальных доноров-людей готовят из лейкоцитарных пленок путем выделения CD14-положительных клеток с использованием гранул с антителом к CD14 и магнитного сепаратора. CD14-положительные клетки высевали при 5°6 клеток на лунку и дифференцировали в незрелые дендритные клетки путем инкубации с 20 нг/мл IL-4 и 40 нг/мл GM-CSF в полных средах RPMI, содержащих 10% фетальной бычьей сыворотки, в течение 3 дней при 37°С и 5% CO₂. Через четыре дня (день четыре) среду заменяют, и к клеткам добавляют свежую среду, содержащую 3 мкМ антитела. На день пять 5 мкг/мл ЛПС добавляют для трансформации клеток в зрелые

дендритные клетки. На день шесть клетки лизируют в 1 мл буфера RIPA с ингибиторами протеаз и лизат замораживают при -80°C.

- Образцы готовят для выделения ГКГС-II путем размораживания замороженного лизата и гомогенизации в течение 5-10 секунд. Гомогенизированные лизаты очищают
- 5 центрифугированием. Иммунопреципитацию комплексов ГКГС-II выполняют с использованием биотинилированного антитела к ГКГС-II, связанного со стрептавидиновыми гранулами. Связанный комплекс элюируют 5% уксусной кислотой, 0,1% ТФУ. Пептиды ГКГС-II отделяют от совместно элюирующихся рецепторных белков путем пропускания элюата через предварительно промытый фильтр с НОММ 10 тыс.
- 10 Выделенные пептиды ГКГС-II анализируют методом нано-ЖХ/МС с использованием масс-спектрометра Thermo QE-HFX. Идентификацию пептидов проводят с помощью цепи процессов протеомики с использованием поисковых алгоритмов без фермента и базы данных крупного рогатого скота/человека с приложенными последовательностями тестируемых антител для определения процента доноров, у которых наблюдаются
- 15 пептиды ГКГС-II из определяющих комплементарность участков тестируемого антитела.

Следуя методикам по существу так, как описано выше, показано, что антитело 1 продемонстрировало низкий риск иммуногенности, о чем свидетельствуют 0% доноров, у которых наблюдаются кластеры, не относящиеся к зародышевой линии, в CDR3 тяжелой цепи.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

LCDR1 антитела 1 (SEQ ID NO: 1)

RASQAIRDDLGLG

5

LCDR2 антитела 1 (SEQ ID NO: 2)

YAASSLQS

LCDR3 антитела 1 (SEQ ID NO: 3)

10

LQNYNYPHT

HCDR1 антитела 1 (SEQ ID NO: 4)

GFSFNTYWIG

15

HCDR2 антитела 1 (SEQ ID NO: 5)

IIYPGDQDIRYSPSFQG

HCDR3 антитела 1 (SEQ ID NO: 6)

ARYGRYIYGYYGGYHGMDV

20

LCVR антитела 1 (SEQ ID NO: 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIRDDLGLWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQNYNYPHTFGQGGTKLEIK

25

HCVR антитела 1 (SEQ ID NO: 8)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFSFNTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGD
QDIRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYGRYIYGYYGGYHGMD
VWGQGTTVTVSS

30

LC антитела 1 (SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIRDDLGLWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQNYNYPHTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

35

НС антитела 1 (SEQ ID NO: 10)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFSFNTYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGD
QDIRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYGRYIYGYYGGYHGMD
VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
5 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLG

10

БКД TREM2-His человека (SEQ ID NO: 11)

HNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRRVSTHNLWL
LSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADTLRKVLVEVLA
DPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSHHHHHH

15

БКД TREM2-His мыши (SEQ ID NO: 12)

LNTTVLQGMAGQSLRVSCITYDALKEHWGRRKAWCRQLGEEGPCQRRVSTHGVWL
LAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVTITLKNLQAGDAGLYQCQSLRGREAEVLQKVLVEVL
EDPLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTSRNQETSFPPTSHHHHHH

20

БКД TREM2-HIS кролика (SEQ ID NO: 13)

NTTVFQGVAGQSLRVSCPYDSATHWGRRKAWCRQLGEEGPCERVVSTHSWWLLS
FLKRRNGSTAITDDALGGTLTVTLRDLQAQDAGVYQCQSLQGREASTLQKILVEVLTEP
LEHEHAGDFWVPEESGSFEDPPVERSSSRSPSEGEPSPFPASGGGGQHHHHHH

25

БКД TREM2-His крысы (SEQ ID NO: 14)

NTTVLQGVAGQSLRVSCITYDALRHWGRRKAWCRQLAEEGPCQRRVSTHGVWLL
AFLRKQNGSTVITDDTLAGTVTITLRNLQAGDAGLYQCQSLRGREAEVLQKVVEVLE
DPLDDQDAGDLWVPEESESFEQAQVEHSTSRSQSGGGGQHHHHHH

30

БКД TREM2-His яванской макаки (SEQ ID NO: 15)

HNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRRVSTHNLWL
LSFLRRRNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGFYQCQSLHGSEADTLRKVLVEVLAD
PLDHRDAGDLWVPEESESFEQAQVEHSTSRSPSQGSHLPSCLSKEGGGGQHHHHHH

35

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает TREM2, содержащее вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем указанная LCVR содержит определяющие комплементарность участки (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и
5 указанная HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2, и HCDR3, и при этом LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1, LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2, LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 3, HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4, HCDR2 имеет
10 аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 5, и HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанная LCVR имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 7, и указанная HCVR имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.
- 15 3. Антитело по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит LC и HC, и при этом указанная LC имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, и указанная HC имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10.
4. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-3 и один
20 или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.
5. Фармацевтическая композиция по п. 4 для применения в лечении нейродегенеративного заболевания.
6. Фармацевтическая композиция для применения по п. 5, отличающаяся тем, что
25 указанное нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС или лобно-височную деменцию.
7. Фармацевтическая композиция для применения по п. 4 для применения в лечении черепно-мозговой травмы.
- 30 8. Способ лечения пациента, имеющего нейродегенеративное заболевание или черепно-мозговую травму, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-3.
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный пациент имеет нейродегенеративное заболевание.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанное нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС или лобно-височную деменцию.
11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный пациент имеет черепно-мозговую травму.
12. Антитело по любому из пп. 1-3 для применения в терапии.
13. Антитело по любому из пп. 1-3 для применения в лечении нейродегенеративного заболевания или черепно-мозговой травмы.
14. Антитело для применения по п. 13 для лечения нейродегенеративного заболевания.
- 10 15. Антитело для применения по п. 14, отличающееся тем, что указанное нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС или лобно-височную деменцию.
16. Антитело для применения по п. 13 для лечения черепно-мозговой травмы.
- 15 17. Применение антитела по любому из пп. 1-3 в изготовлении лекарственного средства для лечения нейродегенеративного заболевания или черепно-мозговой травмы.
18. Применение по п. 17 в изготовлении лекарственного средства для лечения нейродегенеративного заболевания.
19. Применение по п. 18, отличающееся тем, что указанное нейродегенеративное
- 20 заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, прогрессирующий церебральный паралич, рассеянный склероз, БАС, черепно-мозговую травму или лобно-височную деменцию.
20. Применение по п. 17 в изготовлении лекарственного средства для лечения черепно-мозговой травмы.