

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291834 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.13

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

(22) Дата подачи заявки
2021.01.13

(54) АНТИТЕЛА К TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/960,663; 63/070,728; 63/091,717
(32) 2020.01.13; 2020.08.26; 2020.10.14
(33) US
(86) PCT/US2021/013200
(87) WO 2021/146256 2021.07.22
(71) Заявитель:
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Деннис Марк С., Гу Чжэньюй,
Кариолис Михалис С., Мэхон
Катал С., Монро Кэтрин М.,
Парк Джошуа И., Пророк Рейчел,
Сильверман Адам П., Ван Ленгерих
Бетина (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.

202291834
A1

202291834

A1

АНТИТЕЛА К TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/960663, поданной 13 января 2020 г., предварительной заявке на патент США № 63/070728, поданной 26 августа 2020 г., и предварительной заявке на патент США № 63/091717, поданной 14 октября 2020 г., раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей 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-Хаккола, 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 антитела, которые специфически связываются с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках 2, (TREM2). В некоторых вариантах осуществления антитела содержат модифицированный полипептид Fc, который может связываться с белком рецептора трансферрина. В любом из описанных в данном документе вариантов осуществления антитело может содержать CDR, VH и/или VL в соответствии с любой из иллюстративных последовательностей, представленных в данном документе, и может дополнительно содержать модифицированный полипептид Fc, содержащий мутации, связывающие рецептор трансферрина, как указано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с TREM2, содержит:

- (a) вариabельную область, содержащую:
 - i. последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), где α_6 представляет собой D или N;

ii. последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), где β_5 представляет собой К или R; β_6 представляет собой А или Р; β_8 представляет собой G или А; β_{11} представляет собой А или Т; и β_{12} представляет собой G или D;

iii. последовательность CDR-H3, включающую последовательность γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), где γ_1 представляет собой А или Т; и γ_4 представляет собой Т или S;

iv. последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), где δ_{10} представляет собой N или Т;

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

vi. последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T (SEQ ID NO:32), где ϕ_6 представляет собой Y или F;

(b) первый полипептид Fc, модифицированный для специфического связывания с рецептором трансферрина; и

(c) второй полипептид Fc.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и второй полипептид Fc связываются с образованием димера Fc.

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

В некоторых вариантах осуществления вариabельная область 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 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; 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,

последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24 и 26.

В определенных вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:15. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H включает SEQ ID NO:15.

В определенных вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:24. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:24. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H включает SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта переменная область содержит последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22 и 27.

В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L включает SEQ ID NO:16.

В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L включает SEQ ID NO:22.

В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L включает SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта переменная область 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

(с) 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

(е) последовательность V_H, включающую SEQ ID NO:21, 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:27.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит: Trp, Leu или Glu в положении 380; Tyr или Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser, Ala или Val в положении 389; Ser или Asn в положении 390; Thr или Ser в положении 413; Glu или Ser в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc связывается с апикальным доменом рецептора трансферрина. В конкретных вариантах осуществления антитело имеет улучшенное поглощение мозгом по сравнению с антителом, содержащим димер Fc дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc имеет замену T366W, а второй полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU.

В других вариантах осуществления первый полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc имеет замену T366W согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй

полипептид Fc содержат модификацию, снижающую эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления модификация, снижающая эффекторную функцию, включает замену Ala в положении 234 и Ala в положении 235 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат аминокислотные модификации относительно нативной последовательности Fc, которые удлиняют время полужизни в сыворотке. В определенных вариантах осуществления аминокислотные модификации включают замены Leu в положении 428 и Ser в положении 434 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:41 или SEQ ID NO:64, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:41; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L, включающую SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:64; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L, включающую SEQ ID NO:22. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:42; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:65; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:66, а второй полипептид Fc

содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:44; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:66; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:67; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:68, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:68, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:61 или SEQ ID NO:84. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:84; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:52; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:50 или SEQ ID NO:70, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:50; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L, включающую SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:70; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L, включающую SEQ ID NO:22. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:51; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54. В определенных вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:71; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:41; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H, включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L, включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:42; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь

(LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:64; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:65; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:44; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:66; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В

некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:67; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую

тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47 (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления (i) первая тяжелая цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48; (ii) вторая HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:52; и (iii) первая и вторая легкая цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:50; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:51; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), при этом указанное антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:70; (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:63; и (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:71; (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, антитело снижает уровни растворимого белка TREM2 (sTREM2). В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает активность TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает фагоцитоз или усиливает миграцию, дифференцировку, функцию или выживаемость миелоидных клеток, микроглии или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает функцию микроглии без усиления нейровоспаления. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает фосфорилирование Syk. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает фосфорилирование Syk в присутствии лиганда TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело проявляет перекрестную реактивность с белком TREM2 яванского макака.

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте изобретение относится к набору, содержащему: выделенное антитело, описанное в данном документе, или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе; и инструкции по их применению.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту выделенного антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной 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, паллидопонтонигральной 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 другом аспекте изобретение относится к способу снижения уровней sTREM2 у субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, включающему введение субъекту выделенного антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу повышения активности TREM2 у субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, включающему введение субъекту выделенного антитела, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из SEQ ID NO:42, 45, 48, 51, 53, 54 и 61.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:42, 53 и 54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду,

содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:45, 53 и 54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:48, 53 и 54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:48, 52 и 54.

В еще одном аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:51, 53 и 54.

В еще одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, описанный в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, описанный в данном документе, или вектор, описанный в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу экспрессии антитела, которое специфически связывается с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), включающему: культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии антитела.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1H включены кривые связывания клеток с титрованием по дозе в клетках НЕК, сверхэкспрессирующих человеческий TREM2-Dap12, для гуманизированных и оптимизированных по последовательности вариантов репрезентативного антитела к TREM2 (CL0020188).

На фиг. 2 представлены кривые связывания доза-ответ для TREM2 человека в клетках НЕК 293 для репрезентативного ATV:TREM2 и соответствующего антитела к TREM2 с Fc, не связывающим трансферрин, («анти-TREM2»).

На фиг. 3 включены кривые доза-ответ для активации сигнала pSyk репрезентативным ATV:TREM2 и соответствующим антителом к TREM2 (IgG к TREM2) в клетках НЕК 293, экспрессирующих TREM2.

На фиг. 4A и 4B включены кривые доза-ответ для клиренса липидов в образованной из ИПСК микроглии в ответ на обработку репрезентативным ATV:TREM2.

На фиг. 5A и 5B показаны репрезентативные изображения накопления липидов в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных ATV:TREM2 после стимуляции олеиновой кислотой (фиг. 5A) с количественным определением накопления липидов в обработанных клетках (фиг. 5B).

На фиг. 5C представлена тепловая карта, иллюстрирующая модуляцию уровней

соединений триглицерида, ацилкарнитина и промежуточных соединений цикла Кребса в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных ATV:TREM2 после стимуляции миелином.

На фиг. 5D-5F включены гистограммы, иллюстрирующие изменение уровней репрезентативных соединений триглицерида, ацилкарнитина и промежуточных соединений цикла Кребса в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных ATV:TREM2 после стимуляции миелином.

На фиг. 6A-6C включены гистограммы, иллюстрирующие изменение уровней специфических соединений триглицерида, церамида и ацилкарнитина в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных ATV:TREM2 после стимуляции миелином.

На фиг. 7A включены репрезентативные изображения вестерн-блоттинга мишеней сигнального пути mTOR в образованной из ИПСК микроглии, обработанной ATV:TREM2.

На фиг. 7B-7E включены графики, иллюстрирующие изменение уровней мишеней сигнального пути mTOR в образованной из ИПСК микроглии, обработанной ATV:TREM2.

На фиг. 8 представлена гистограмма, иллюстрирующая изменение уровней програнулина (PGRN) в образованной из ИПСК микроглии, обработанной ATV:TREM2.

На фиг. 9 представлена гистограмма, иллюстрирующая изменение уровней репрезентативных соединений бис(моноацилглицеро)фосфата (BMP) в образованной из ИПСК микроглии, обработанной ATV:TREM2.

На фиг. 10A представлен репрезентативный кинетический график потребления кислорода образованными из ИПСК микроглиальными клетками, обработанными ATV:TREM2.

На фиг. 10B представлена гистограмма, иллюстрирующая максимальную дыхательную способность образованных из ИПСК микроглиальных клеток, обработанных ATV:TREM2, в присутствии и в отсутствие ингибитора CPT1.

На фиг. 11A представлена кривая доза-ответ для жизнеспособности клеток в макрофагах человека, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 11B и 11C включены гистограммы, иллюстрирующие EC50 и Emax для кривых доза-ответ на фиг. 11A.

На фиг. 12 представлена тепловая карта относительного высвобождения цитокинов в макрофагов человека, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 13A-13C включены вулканские диаграммы, которые иллюстрируют

относительные изменения в соединениях триглицерида в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 13D и 13E включены гистограммы, демонстрирующие изменение уровней репрезентативных соединений триглицеридов в образованных из ИПСК микроглиальных клетках, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 14A представлен график зависимости уровня TREM2 от концентрации антител в лизате образованных из ИПСК микроглиальных клеток, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 14B представлен график зависимости уровня TREM2 от концентрации антител в среде культивирования образованных из ИПСК микроглиальных клеток, обработанных антителами к TREM2.

На фиг. 15 представлен график, иллюстрирующий фармакокинетический профиль антител у TREM2, которые вводили яванским макакам.

На фиг. 16A и 16B представлены графики, демонстрирующие количество EdU^+Iba^+ клеток на мм^2 (фиг. 16A) и относительную Iba^+ площадь (фиг. 16B) в головном мозге мышей TB36/hTfR KI, получавших либо ATV:TREM2, либо ATV:RSV.

На фиг. 17A и 17B представлены графики, демонстрирующие количество EdU^+Iba^+ клеток на мм^2 (фиг. 17A) и относительную Iba^+ площадь (фиг. 17B) в головном мозге мышей TB36/hTfR KI, получавших либо ATV:TREM2, либо соответствующее антитело к TREM2, эталонное антитело №2, либо ATV:RSV. Графики отображают средние значения $\pm\text{COC}$ и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

На фиг. 18A и 18B представлены графики, демонстрирующие уровни цитокинов IP-10 (фиг. 18A) и MCP-5 (фиг. 18B) в головном мозге мышей TB36/hTfR KI, получавших либо ATV:TREM2, либо соответствующее антитело к TREM2, эталонное антитело №2, либо ATV:RSV. Графики отображают средние значения для экспериментальных повторностей $\pm\text{COC}$. Графики отображают средние значения $\pm\text{COC}$ и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

На фиг. 19 представлен график, демонстрирующий уровень глиального маркера CSF1R в головном мозге мышей TB36/hTfR KI, получавших либо ATV:TREM2, либо соответствующее антитело к TREM2, эталонное антитело №2 или ATV:RSV. Графики отображают средние значения $\pm\text{COC}$ и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ с тестом множественных сравнений Тьюки; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

На фиг. 20 представлен график, демонстрирующий фармакокинетический профиль ATV:TREM2, соответствующего антитела TREM2, эталонного антитела №2 или ATV:RSV в плазме у мышей TB36/hTfR KI.

На фиг. 21 представлен график, демонстрирующий фармакокинетический профиль ATV:TREM2, соответствующего антитела TREM2, эталонного антитела №2 или ATV:RSV в головном мозге у мышей TB36/hTfR KI.

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. В определенных вариантах осуществления антитела дополнительно содержат полипептид Fc, содержащий мутации, которые позволяют связывать полипептид Fc с рецептором трансферрина (TfR, например, человека). В некоторых аспектах описанные в данном документе антитела способны связываться посредством модифицированного полипептида Fc с белком рецептора трансферрина (например, экспрессированным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга (BEC)) и, таким образом, могут преодолевать гематоэнцефалический

барьер (ГЭБ) более эффективно, чем антитела, лишённые Tfr-связывающих мутаций Fc. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат мутации в полипептиде Fc, которые снижают или устраняют эффекторную функцию, и мутации, которые увеличивают время полужизни *in vivo*, например, за счёт увеличения связывания Fc антитела с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

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 шеддинг 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, моноспецифические 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 переменные области, включая, но не ограничиваясь этим, Fab, F(ab')₂, 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.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающая часть антитела к TREM2» относится к антигенсвязывающему сегменту или соединению, которое специфически связывается с белком TREM2 (например, TREM2 человека). 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 переменную область. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}), фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в области петли), одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидсвязанный Fv (dsFv), определяющие комплементарность области (CDR), V_L (переменную область легкой цепи) и V_H (переменную область тяжелой цепи).

Термин «переменная область» или «переменный 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_μ и C_δ) гена), и это придает антителу его специфичность связывания с антигеном. Обычно переменная 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 переменными 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_H или CDR-H3 находится в переменной области тяжелой цепи антитела, в которой он обнаружен, тогда как CDR1 V_L или CDR-L1 представляет собой CDR1 переменной 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 переменной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных переменных 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.

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.

«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.

«Гуманизированное 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, гуманизированное 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 5 раз, 10 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⁻¹), разделенной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ М⁻¹). 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 «рецептор трансферрина» или «TfR», используемый в данном документе, относится к белку 1 рецептора трансферрина. Последовательность полипептида рецептора трансферрина 1 человека представлена в SEQ ID NO:62. Также известны последовательности белка трансферринового рецептора 1 других видов (например, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резуса, NP_001244232.1; собаки, NP_001003111.1; крупного рогатого скота, NP_001193506.1; мыши, NP_035768.1; крысы, NP_073203.1; и курицы, NP_990587.1). Термин «рецептор трансферрина» также включает аллельные варианты иллюстративных эталонных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе белка рецептора трансферрина 1. Полноразмерный белок рецептор трансферрина включает короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и большой внеклеточный домен. Внеклеточный домен характеризуется тремя доменами: протеазоподобным доменом, спиральным доменом и апикальным доменом. Последовательность апикального домена рецептора трансферрина 1 человека представлена в SEQ ID NO:55.

В контексте данного документа термины «домен CH3» и «домен CH2» относятся к полипептидам домена константной области иммуноглобулина. В контексте данного документа антитела IgG, полипептид домена CH3 относится к сегменту аминокислот от примерно положения 341 до примерно положения 447, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU, а полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот примерно с положения 231 до примерно положения 340, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU. Полипептиды доменов CH2 и CH3 также могут быть пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в

которой нумерация доменов CH2 составляет 1-110, а нумерация доменов CH3 составляет 1-107, в соответствии с Научной нумерацией диаграмм IMGT (веб-сайт IMGT). Домены CH2 и CH3 являются частью Fc-области иммуноглобулина. В контексте антител IgG область Fc относится к сегменту аминокислот от примерно положения 231 до примерно положения 447, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU. В контексте данного документа термин «область Fc» также может содержать по меньшей мере часть шарнирной области антитела. Иллюстративная последовательность частичной шарнирной области представлена в SEQ ID NO:57.

Термины «соответствующий», «определенный со ссылкой на» или «пронумерованный со ссылкой на», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной последовательности, относятся к положению остатка указанной эталонной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с эталонной последовательностью. Так, например, аминокислотный остаток в полипептиде «соответствует» аминокислоте в области SEQ ID NO:38 из аминокислот 111-217, когда остаток соответствует аминокислоте в SEQ ID NO:38 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:38. Полипептид, который выровнен с эталонной последовательностью, не обязательно должен иметь ту же длину, что и эталонная последовательность.

В контексте данного документа термин «полипептид Fc» относится к С-концевой области встречающегося в природе полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig в виде структурного домена. Полипептид Fc содержит последовательности константной области, включая по меньшей мере домен CH2 и/или домен CH3, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области, но не содержит вариабельную область.

«Модифицированный полипептид Fc» относится к полипептиду Fc, который имеет по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью полипептида Fc тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа, но сохраняет общую укладку Ig или структуру нативного полипептида Fc.

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, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Встречающиеся в природе α -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. Стереоизомеры встречающихся в природе α -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. α -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 -NH₂. 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 белковых последовательностей с параметрами по умолчанию.

Термины «субъект», «индивид» 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 улучшение 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, внутривенную 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 предложены антитела, 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. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит полипептиды Fc, которые содержат одну или более модификаций, как описано в данном документе.

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.

Последовательности антитела к TREM2

В некоторых вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи или ее часть и/или последовательность легкой цепи или ее часть получены из антитела к TREM2, описанного в данном документе (например, клона CL0020306, клона CL0020188 или клона CL0020307). Аминокислотные последовательности CDR, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи этих клонов представлены в таблице 8.

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 и 12, или имеющей до двух аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:4 и 12;

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

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

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

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

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

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

(b) CDR-H2, включающей аминокислотную последовательность из любой из SEQ ID NO:5, 13 и 25.

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

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

(e) CDR-L2, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; и

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

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,

(с) 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

(e) 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

(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; или

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 и 26. 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 и 26.

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 и 27. 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 27.

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 и 26, 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, и 27. 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, и 26, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, и 27.

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

(с) 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

(е) 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: 21, 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 последовательности с SEQ ID NO:24, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:20; или

(i) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:26, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO:20; или

(j) 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: 22; или

(k) последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 26, и последовательность V_L , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22; или

(l) 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:27.

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:28-32. В консенсусных последовательностях SEQ ID NO:28-32 заглавная буква обозначает аминокислотный остаток, который абсолютно консервативен среди выровненных последовательностей (например, выровненных последовательностей CDR), а «X» или греческая буква (например, « α », « β », « γ », « δ », « ϵ » или « ϕ ») 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.

Клоны CL0020188, CL0020306, CL0020307, и варианты CL0020188

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит:

- (a) последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), где α_6 представляет собой D или N;
- (b) последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- β_5 - β_6 -

N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), где β_5 представляет собой K или R; β_6 представляет собой A или P; β_8 представляет собой G или A; β_{11} представляет собой A или T; и β_{12} представляет собой G или D;

(с) последовательность CDR-H3, включающую последовательность γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), где γ_1 представляет собой A или T; и γ_4 представляет собой T или S;

(d) последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), где δ_{10} представляет собой N или T;

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

(f) последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T (SEQ ID NO:32), где ϕ_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 и 26. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 10, 15, 19, 21, 24 и 26.

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:3, 11, 16, 20, 22 и 27. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22

и 27.

Клон 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 вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

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, 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:16. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

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 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 вариабельную 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 конкурирует за связывание с антителом, как описано в данном документе (например, антитело, содержащее CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 5, 17, 7, 8 и 18, соответственно, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную 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: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 или его антигенсвязывающая часть 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:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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:22. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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:24, и 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:22. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25 и 17, соответственно, и 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 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную 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 или его антигенсвязывающая часть 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 вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22).

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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 или его антигенсвязывающая часть 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:24. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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:27. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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:24, и 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:27. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его

антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1-3 тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 25 и 17, соответственно, и 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 или его антигенсвязывающая часть 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%, 95% или 97% идентичности последовательности) с SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 или его антигенсвязывающая часть 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 вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27).

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 или его антигенсвязывающая часть 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 вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

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, 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:11. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит вариабельную

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 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: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 вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и вариабельную 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 другими 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 их вариантов.

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 внутри 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 внутри или состоящий из остатков 129-148 SEQ ID NO:1 (например, 143-148 SEQ ID NO:1). 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 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).

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 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, дифференцировку клеток, секрецию цитокинов или миграцию клеток.

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'-оксвалероил)-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 (AC), алкилацилглицерофосфохолин (PAF), α-галактозилцерамид (KRN7000), бис(моноацилглицеро)фосфат (BMP), кардиолипин

(CL), церамид, церамид-1-фосфат (C1P), холестериновый эфир (CE), фосфат холестерина (CP), 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 A (KLA), лактозилцерамид (LacCer), лизоалкилацилглицерофосфохолин (LPAF), лизофосфатидную кислоту (LPA), лизофосфатидилхолин (LPC), лизофосфатидилэтаноламин (LPE), лизофосфатидилглицерин (LPG), лизофосфатидилинозитол (LPI), лизосфингомиелин (LSM), лизофосфатидилсерин (LPS), N-ацилфосфатидилэтаноламин (NAPE), N-ацилсерин (NSer), окисленный фосфатидилхолин (oxPC), пальмитиновую кислоту-9-гидроксистеариновую кислоту (PAHSA), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилэтанол (PEtOH), фосфатидную кислоту (PA), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидилинозитол (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 TREM2 изменяет уровни белка sTREM2 в образце, например, уровни sTREM2, который слущивается с поверхности клетки во внеклеточный образец. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 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 клеточной дифференцировки, функции, миграции и выживаемости

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, такие как 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 функцию 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- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-1 α , ТФР- β , ИЛ-15 или ИФН- γ , 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. Мутации полипептида Fc белков, имеющих антигенсвязывающую часть антитела к TREM2

В некоторых аспектах антитело к TREM2 содержит два полипептида Fc, один или оба из которых могут содержать независимо выбранные модификации (например, мутации) или могут представлять собой полипептид Fc дикого типа, например, полипептид Fc IgG1 человека. Неограничивающие примеры мутаций, которые могут быть введены в один или оба полипептида Fc, включают, например, мутации, позволяющие связывать полипептид Fc (или антитело, содержащее его) с рецептором ГЭБ, таким как белок рецептора трансферрина (TfR) (например, TfR человека или яванского макака, который может быть экспрессирован на эндотелиальной клетке головного мозга), мутации для повышения стабильности в сыворотке, для модуляции эффекторной функции, для влияния на гликозилирование, для снижения иммуногенности у людей и/или для обеспечения гетеродимеризации полипептидов Fc по типу «выступ-во-впадину».

Мутации, связывающие рецептор трансферрина

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий модификации (например, аминокислотные замены), которые позволяют связывать полипептид Fc с белком TfR. Вкратце, связывание с белком TfR (например, с его апикальным доменом), который экспрессируется, например, на эндотелиальной клетке головного мозга, в некоторых вариантах осуществления может позволить модифицированный полипептид Fc по настоящему изобретению или антитело, содержащее его, преодолевают гематоэнцефалический барьер посредством рецепторопосредованного транцитоза. В определенных вариантах осуществления рецепторопосредованный транцитоз может усиливать или улучшать способность белка, содержащего полипептид Fc, присутствовать в головном мозге (т.е. на люминальной стороне гематоэнцефалического барьера), что может обеспечивать улучшенное

связывание с TREM2 в ЦНС и другие функции, например, клиренс, нейтрализацию или иммунодефицит мишени и т.п.

Примеры TfR-связывающих аминокислотных модификаций Fc (например, части, фрагмента или домена CH2 и/или CH3) и полипептидов Fc и их частей, которые содержат аминокислотные модификации, описаны в патентной публикации РСТ № WO 2018/152326A1. Эти аминокислотные модификации, TfR-связывающие полипептидные последовательности Fc и TfR-связывающие полипептиды Fc, а также способы их получения и тестирования включены в данный документ посредством ссылки. Один или два полипептида Fc димера Fc по настоящему изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали модификации, позволяющие связываться с TfR. В некоторых вариантах осуществления один полипептид Fc димера Fc содержит модификации, позволяющие связываться с TfR, а другой полипептид Fc – нет.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мотив YxTEWSS (SEQ ID NO:58). В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мотив TxxExxxxF (SEQ ID NO:59). В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мотив YxTEWSS (SEQ ID NO:58) и TxxExxxxF (SEQ ID NO:59).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит аминокислотный остаток дикого типа в положениях 380, 389, 390 и 415 согласно нумерации EU, где аминокислотный остаток дикого типа находится в соответствующем положении в SEQ ID NO:38.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий следующие аминокислоты: Trp, Leu или Glu в положении 380; Tyr или Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser, Ala или Val в положении 389; Ser или Asn в положении 390; Thr или Ser в положении 413; Glu или Ser в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий следующие аминокислоты: Trp в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser в положении 389; Ser в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий следующие аминокислоты: Glu в положении 380; Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser в положении 389;

Asn в положении 390; Ser в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий следующие аминокислоты: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Val в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 включает полипептид Fc, содержащий следующие аминокислоты: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser в положении 389; Asn в положении 390; Ser в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:40, 43, 46, и 49. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO:41, 44, 47, и 50.

Дополнительные примеры модифицированных полипептидов Fc описаны в таблице 8.

Мутации, способствующие гетеродимеризации полипептидов Fc

В некоторых вариантах осуществления полипептиды Fc, присутствующие в антителе против TREM2, как описано в данном документе, включают мутации по типу «выступы» и «впадины», способствующие образованию гетеродимера и препятствующие образованию гомодимера. Как правило, модификации вводят выпуклость («выступ») на границе раздела первого полипептида и соответствующую полость («впадину») на границе раздела второго полипептида, так что выпуклость может быть расположена в полости так, что это способствует образованию гетеродимера и, таким образом, препятствует образованию гомодимера. Выпуклости образуются путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или подобного размера выпуклостям создаются на границе раздела второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные мутации находятся в положении полипептида Fc, которое не оказывает

отрицательного (например, ингибирующего) действия на связывание полипептида Fc с рецептором ГЭБ, например, TfR.

В одном иллюстративном варианте осуществления подхода «выступ-во-впадину» для димеризации положение 366 (нумерация согласно схеме нумерации EU) одного из полипептидов Fc, присутствующих в белках, описанных в данном документе, содержит триптофан вместо нативного треонина. Другой полипептид Fc в димере имеет валин в положении 407 (пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU) вместо нативного тирозина. Другой Fc-полипептид может дополнительно содержать замену, при которой нативный треонин в положении 366 (пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU) заменен серином, а нативный лейцин в положении 368 (пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU) заменен на аланин. Таким образом, один из полипептидов Fc белка антитела к TREM2 по настоящему изобретению имеет мутацию по типу «выступа» T366W, а другой полипептид Fc имеет мутацию Y407V, которая, как правило, сопровождается мутациями по типу «впадины» T366S и L368A.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc также могут быть сконструированы так, чтобы они содержали другие модификации для гетеродимеризации, например, модификацию электростатических взаимодействий контактных остатков на поверхности взаимодействия CH3-CH3, которые представляют собой модификации естественно заряженных или гидрофобных участков.

В некоторых вариантах осуществления могут быть введены модификации для увеличения периода полужизни в сыворотке. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в белке антитела к TREM2 по настоящему изобретению, могут содержать тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M252Y, S254T и T256E. Альтернативно, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M428L и/или N434S в соответствии с нумерацией EU. В альтернативном варианте один или оба полипептида Fc могут содержать замену N434S или N434A.

Эффекторные функции Fc

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc в белке антитела к TREM2, описанном в данном документе, могут содержать модификации, снижающие эффекторную функцию, т.е. обладающие сниженной способностью индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, который опосредует эффекторную функцию.

Примеры эффекторных функций антитела включают, но не ограничиваются ими, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание рецептора Fc; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток. Эффекторные функции могут варьироваться в зависимости от класса антител. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активности АЗКЦ и КЗЦ при связывании с подходящим рецептором Fc, присутствующим в клетке иммунной системы; а нативные IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека могут вызывать функции АЗКФ при связывании с подходящим рецептором Fc, присутствующим на иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут включать модификации, модулирующие эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут содержать модификации, которые снижают или устраняют эффекторную функцию. Иллюстративные мутации Fc-полипептида, снижающие эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, замены в домене CH2, например, в положениях 234 и 235, в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида могут содержать остатки аланина в положениях 234 и 235. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены L234A и L235A (LALA).

Дополнительные мутации полипептида Fc, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, следующее: позиция 329 может содержать мутацию, в которой пролин заменен глицином, аргинином, серином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения поверхности контакта Fc/Fc γ -рецептора, которая образуется между пролином 329 из Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 из Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D, N297G и P331S в соответствии со схемой нумерации EU. Также могут присутствовать множественные замены, например, L234A и L235A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329G области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329S области Fc IgG1 человека; S228P и L235E области Fc IgG4 человека; L234A и G237A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и G237A области Fc IgG1 человека; V234A и G237A области Fc IgG2 человека; L235A, G237A и E318A области Fc IgG4 человека; и S228P и L236E области Fc IgG4 человека в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут иметь

одну или более аминокислотных замен, которые модулируют АКЗЦ, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334, в соответствии со схемой нумерации EU.

Сайты связывания FcRn и мутации для увеличения периода полужизни в сыворотке

В некоторых аспектах полипептиды Fc (например, модифицированные полипептиды Fc), присутствующие в белке антитела к TREM2 по настоящему изобретению, могут содержать сайт связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn находится внутри полипептида Fc или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn содержит нативный сайт связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn не содержит аминокислотных изменений относительно аминокислотной последовательности нативного сайта связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления нативный сайт связывания FcRn представляет собой сайт связывания IgG, например, сайт связывания IgG человека. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn содержит модификацию, которая изменяет связывание FcRn.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn имеет один или более аминокислотных остатков, которые являются мутированными, например, замещенными, причем мутации(-я) увеличивают период полужизни в сыворотке или существенно не уменьшают период полужизни в сыворотке (т.е. уменьшают период полужизни в сыворотке не более чем на 25% по сравнению с аналогичным полипептидом Fc, имеющим остатки дикого типа в мутированных положениях при анализе в тех же условиях). В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn имеет один или более аминокислотных остатков, которые замещены в положениях 251-256, 428, и 433-436 в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления один или более остатков на сайте связывания FcRn или рядом с ним являются мутированными относительно нативной последовательности IgG человека для увеличения периода полужизни полипептида в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в одно, два или три положения 252, 254 и 256. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой M252Y, S254T и T256E. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит мутации M252Y, S254T и T256E. В конкретных вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в белке антитела к TREM2 по данному изобретению, могут содержать тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, пронумерованные в

соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M252Y, S254T и T256E.

В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой M428L и/или N434S. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc дополнительно содержит мутацию N434S с M428L или без нее. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутацию в одном, двух или во всех трех положениях T307, E380 и N434 согласно схеме нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой T307Q и N434A. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутации T307A, E380A и N434A. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутации в положениях T250 и M428 согласно схеме нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутации T250Q и/или M428L. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутации в положениях M428 и N434 согласно схеме нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутации M428L и N434S. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать два полипептида Fc, где каждый из двух полипептидов Fc содержит замены M428L и/или N434S. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит мутацию N434S или N434A. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать два полипептида Fc, где каждый из двух полипептидов Fc содержит замену N434S или N434A.

V. 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. Трансгенных мышей или

других организмов, таких как другие млекопитающие, можно использовать 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 вариабельной тяжелой цепи и вариабельной 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')₂, scFv, V_H, или V_{HH}). 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 выделены непосредственно из клеток *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂. В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ 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*.

VI. 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, переменных областей тяжелой цепи и переменных 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, 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, последовательности CDR, тяжелой цепи или легкой цепи), описанные в таблице 8 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 таблице 8 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, mpl8, mpl9, 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).

VII. 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, паллидопонтонигральной 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 осуществление 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. 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.

VIII. 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, внутривентриального, 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 антитела к TREM2 может быть приготовлено путем его объединения с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в

данной области техники. Такие носители позволяют составлять соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и тому подобного для перорального приема пациентом, подлежащим 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 соединение 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.

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 хорошо известно специалисту в данной области техники. Подходящие дозировки также описаны в разделе VII выше.

Наборы

В некоторых вариантах осуществления предложены наборы, содержащие антитело к TREM2. 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 (MAO-B), 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 TREM2, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более реагентов для измерения уровней sTREM2. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело к TREM2, 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.

IX. Примеры

Настоящее изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах. Следующие примеры предложены исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не подразумевают ограничения изобретения.

Пример 1. Получение и первоначальная характеристика антитела к TREM2

Рекомбинантная экспрессия и очистка мышинного 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 мышинной Fc-меткой в C-концевой области с GGGGS (SEQ ID NO:34) 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% CO₂. 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 же после элюирования к раствору белка добавляли 1M буфера трис-HCl с pH 8,0 для нейтрализации pH. Белковые агрегаты разделяли при помощи эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 с увеличением 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

мМ аргинина, который также являлся буфером для хранения белка. Все стадии хроматографии проводили на системах AKTA pure или AKTA 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 мышиного V-III каппа-цепи Ig, аминокислоты 1–20 (UniProtKB ID - P01661) в N-концевой области, и меткой 6X-His (SEQ ID NO:35) в C-концевой области. Вставка была проверена с помощью секвенирования, и была проведена очистка плазмиды *maxi prep*.

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 HT Multitron) при 125 об/мин и 37°C в увлажненной атмосфере с 6% CO₂. 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. Смола 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-меченный эктодомен 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 AKTA Avant (GE Healthcare Life Sciences). Белок загружали на колонку HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences), уравниваемую 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, презентируемые 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.

Пример 2. 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 Biacore и связывания с клетками HEK293-H6 с титрованием по дозе (репрезентативные протоколы см. в примере 5).

Пример 3. Получение антител к TREM2, содержащих модифицированные полипептиды Fc («ATV:TREM2»)

Область Fd (V_H+CH1) гуманизированного антитела к TREM2 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO:22 и 24) клонировали в векторы экспрессии, содержащие последовательность, кодирующую полипептид Fc, сконструированный для связывания с человеческим рецептором трансферрина (TfR) (CH3C.35.23.1.1, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.3 cisLALA или CH3C.35.24), или последовательность, кодирующую полипептид Fc, который связывается с рецептором трансферрина яванского макака (CH3C.35.21). Последовательность, кодирующая полипептид Fc, также содержала мутацию «выступ» (T366W) для предотвращения гомодимеризации и для промотирования гетеродимеризации с полипептидом Fc, содержащим мутации типа «впадина» (T366S/L368A/Y407V). Область Fd также клонировали в соответствующие векторы «впадин», содержащие последовательность, кодирующую полипептид Fc с мутациями по типу «впадина», но без связывающих TfR мутаций. Кодирующие последовательности (конструкции Fd-выступ-Fc и Fd-впадина-Fc) также содержали мутации «LALA» (L234A; L235A) в шарнирной области для снижения эффекторной функции (Wines *et al.*, *J. Immunol.* 164:5313-5318 (2000) и мутации «LS» (M428L; N434S) в области CH3 Fc для увеличения связывания с FcRn (см., например, Zalevsky *et al.*, *Nat. Biotech.* 28(2):157-159 (2010)). Окончательные закодированные последовательности тяжелых цепей, экспрессируемые векторами, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности ATV:TREM2

ATV:TREM2	Первая тяжелая цепь	Вторая тяжелая цепь
#1	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:53
#2	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:53
#3	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:53
#4	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:52
#5	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:53

Соответствующие вышеупомянутые векторы выступов и впадин котрансфицировали в клетки ExpiCHO или Expi293 вместе с соответствующим вектором легкой цепи (SEQ ID NO:54) в соотношении выступ:впадина:легкая цепь 1:1:2. Экспрессированный белок очищали с помощью хроматографии на основе белка А с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (ЭХ) для выделения очищенного белка к TREM2.

Связывание белка антитела к TREM2 с рецептором трансферрина человека определяли следующим образом: антитело к Fab человека иммобилизовали на чипе CM5, а белок антитела к TREM2 захватывали. Полноразмерный TfR человека или апикальный домен TfR человека при серийных разведениях (например, концентрации 1-1000 нМ) пропускали через чип (время ассоциации 180 секунд), а затем оставляли диссоциировать. Аппроксимацию проводили с использованием модели связывания 1:1.

Пример 4. Определение характеристик антител к TREM2

В следующих разделах описаны различные анализы, которые были проведены для оценки связывания и функциональных характеристик полученных антител к TREM2.

Измерение аффинности с помощью кинетического измерения 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} . Значение K_D для связывания рассчитывали по k_{on} и k_{off} .

Оценка связывания TREM2 в клетках HEK, экспрессирующих TREM2

Характеристики связывания антител к TREM2 оценивали в клетках HEK 293,

экспрессирующих человеческий TREM2, следующим образом.

Линия клеток HEK 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/мышинное 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 «HEK293-H6». Клоны, стабильно экспрессирующие DAP12, были проанализированы с помощью вестерн-блоттинга, и отобранный клон был назван «HEK293-DAP12#1».

HEK 293, сверхэкспрессирующие TREM2 человека, (HEK293-H6) и HEK 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 200 000 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 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')₂ 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.

Активация TREM2-зависимого сигналинга pSyk

Активацию TREM2-зависимого сигналинга pSyk измеряли в макрофагах 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 готовили в течение двух недель 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) смешивали в хлороформе в стеклянном флаконе и сушили в потоке газа N_2 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 экстрадировали 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 НЕК293-Н6 высевали в количестве 100000 клеток/лунка или 40000 клеток/лунка, соответственно, на 96-луночный планшет, покрытый поли-D-лизином. Антитела разводили в 10-точечном серийном разведении с 3-кратным разведением между точками в PBS. 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 антител/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 Acceptor 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.

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 предварительно покрывали антителом к TREM2 или изотипическим контролем при титровании дозы (45 мкл/лунка, всего 12 точек) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубации в течение ночи предварительно покрытый планшет дважды промывали PBS, а затем загружали моноцитами человека (10^5 клеток/лунка) в присутствии низкой концентрации М-CSF человека (5 нг/мл, Gibco, кат. № PHC9501). Через 5 дней при 37°C среду аспирировали и в каждую лунку добавляли 100 мкл PBS + 100 мкл среды Celltiter-glo (Promega, кат. № G7571). После 10 минут инкубации в среде для клеток переносили в многолуночные планшеты, совместимые с люминометром, и регистрировали люминесценцию для определения жизнеспособности клеток.

Анализ накопления липидов

Перед анализом индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ИПСК) сначала дифференцировали в гемопоэтические клетки-предшественники (ГПК) с использованием коммерчески доступного набора (набор STEMdiff Hematopoietic 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 человека, 30000 клеток/лунка) высевали на покрытые PDL 96-луночные планшеты с полной сывороточной средой. Через 24 часа при 37°C среду заменяли на полную сывороточную среду, содержащую олеиновую кислоту-альбумин (конечная концентрация 10 мкМ или 33 мкМ, Sigma O3008) или очищенный немеченый миелин (конечная концентрация 50 мкг/мл, очищенный из мозга мыши C57Bl/6 дикого типа (Jackson Laboratories) с использованием методов, описанных Safaiyan *et al.* (2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998)). После 24 часов обработки липидами при 37°C среду заменяли на среду, содержащую антитело к TREM2. Для однократных экспериментов используемая концентрация антитела к TREM2 составляла 100 нМ. Для получения кривых доза-ответ среду, содержащую 100 нМ антитела к TREM2, серийно разбавляли в 3 раза, всего до 10 точек. RSV использовали в качестве контроля. Клетки инкубировали в течение еще 48 часов при 37°C перед визуализацией клеток с использованием красителя Bodipy или экстракцией из клеток для липидомики, как описано ниже.

Для визуализации Bodipy супернатант удаляли, а клетки инкубировали при 37°C в течение 30 минут в буфере для визуализации живых клеток (Life Technologies, кат. № A14291DJ), содержащем 1:2500 1 мг/мл раствора Bodipy 493/503 в ДМСО (Thermo-Fisher D3922) и 1 капля/мл Nucblue (ThermoFisher, кат. № R37605). После периода инкубации окрашивающий раствор удаляли, и либо визуализировали живые клетки, либо клетки фиксировали в 4% параформальдегиде. Клетки визуализировали с использованием канала Alexa 488 для Bodipy и настроек свечения 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.

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 C18 1,7 мкм, 2,1×100 мм (Waters Corporation, Milford, 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 (CE); потенциал декластеризации (DP) – 80; входной потенциал (EP) – 10 (режим положительных ионов) или -10 (режим отрицательных ионов), и напряжение на выходе ячейки соударений (CXP) – 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).

Активация TREM2-зависимого сигналинга mTOR

Микроглию человека, образованную из ИПСК дикого типа, культивировали и обрабатывали антителом к TREM2 (конечная концентрация 100 нМ) и либо ДМСО, либо

коммерческим ингибитором mTOR (Selleckchem, кат. № AZD8055, конечная концентрация 20 нМ) в течение 96 часов. Обработанные клетки затем лизировали, а клеточные лизаты готовили для вестерн-блоттинга для исследования фосфорилирования основных сигнальных мишеней в пути mTOR. Первичные антитела для вестерн-блотов были получены от Cell Signaling Technologies: (1) фосфо-mTOR (Ser2448), кат. № 5536T; (2) mTOR (7C10), кат. № 2983T; (3) фосфо-AKT (Ser473), кат. № 9271T; (3) фосфо-GSK-3бета (Ser9), кат. № 5558T; (4) фосфо-S6 рибосомный белок (S235/236), Product No. 4858T; (5) фосфо-4E-BP1 (Thr37/46), кат. № 2855T; (6) бета-актин, кат. № 58169S.

Пример 5. Результаты

Результаты анализа характеристик связывания гуманизированных и оптимизированных по последовательности вариантов антитела CL0020188 представлены в таблице 2 и на фиг. 1А-1Н. Мотивы NG в последовательности CDR-H2 (SEQ ID NO:5) и последовательности CDR-L1 (SEQ ID NO:7) CL0020188 модифицировали, прививали в каркасные области человека и анализировали. В таблице 2 приведены значения K_D , измеренные с помощью Biacore, и значения EC_{50} , измеренные с помощью анализа связывания с титрованием по дозе на клетках HEK293-Н6. На фиг. 1А-1Н включены репрезентативные кривые доза-ответ для связывания с TREM2, экспрессируемым клетками HEK293-Н6, для гуманизированных и оптимизированных по последовательности вариантов. Варианты представлены закрашенными черными кружками (●), а контрольные изотипы представлены незакрашенными белыми кружками (○).

Таблица 2. Характеристики связывания оптимизированных по последовательности и гуманизированных вариантов CL0020188

Клон	hV _H	hV _L	K_D	EC_{50}
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_H

Как показано в таблице 2, 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-Н6, которые проиллюстрированы в таблице 1, с соответствующими кривыми доза-ответ,

представленными на фиг. 1А-1Н. По сравнению с исходным антителом ($EC_{50} = 0,44$ нМ), гуманизированные и оптимизированные по последовательности клоны демонстрировали сопоставимую и субнанолярную аффинность в отношении к TREM2, экспрессированному в клетках HEK293-Н6. В целом, результаты демонстрируют сопоставимую кинетику связывания между исходным антителом и гуманизированными и оптимизированными по последовательности вариантами.

Результаты для вариантов ATV:TREM2, описанных в примере 3, приведены в таблице 3 ниже. Иллюстративная кривая связывания клеток, основанная на связывании с клетками HEK, экспрессирующими TREM2 человека, и анализе методом FACS, проиллюстрирована на фиг. 2.

Таблица 3. Краткая характеристика TREM2 ATV

ATV:TREM2	K _D по Biacore (нМ)			EC ₅₀ (нМ)
	TREM2 человека	TREM2 яванского макака	TfR человека	HEK, экспрессирующие TREM2 человека
#1	БО	БО	БО	БО
#2	5,4	2,4	650	4,9
#3	3,0	2,2	1400	4,6
#4	2,0	2,2	БО	БО
#5	5,7	2,4	620	3,6

БО = будет определено

Антитела также оценивали в отношении TREM2-зависимого сигналинга pSyk в клетках HEK-Н6, способности стимулировать выживаемость макрофагов человека и способности модулировать накопление липидов в образованных из ИПСК микроглиальных клеток человека (далее именуемых «образованная из ИПСК микроглия» или «иМГ»). На фиг. 3 показаны результаты для варианта ATV:TREM2 (ATV:TREM2 №3) и соответствующего антитела к TREM2. ATV:TREM2 был способен активировать сигналинг pSyk в клетках HEK293-Н6, экспрессирующих TREM2, в значительно большей степени, чем соответствующее антитело к TREM2, что указывает на то, что добавление ATV к молекуле может повысить его активность (фиг. 3). Кроме того, ATV:TREM2 индуцировал выживаемость макрофагов с $EC_{50} 4,1 \pm 0,3$ нМ. Наконец, антитела к TREM2 продемонстрировали способность снижать накопление липидов в обработанных миелином иМГ (фиг. 4А и 4В) с IC_{50} для ингибирования накопления липидов $0,20$ нМ ($97,7 \pm 0,3\%$ макс. ингибирования).

Были проведены дополнительные исследования для изучения способности ATV:TREM2 снижать накопление липидов. На фиг. 5А-5F и фиг. 6А-6С показано, что репрезентативный вариант ATV:TREM2 (ATV:TREM2 №3) снижает накопление липидов при одновременном усилении промежуточных продуктов окисления жирных кислот, что указывает на потенциальную роль ATV:TREM2 в усилении митохондриальной функции.

Клетки (иМГ), которые подвергали липидной стимуляции олеиновой кислотой (33 мкМ) с последующей инкубацией с ATV:TREM2, были способны уменьшать накопление липидов, как показано окрашиванием Bodipy (фиг. 5A и 5B). Анализ ЖХ-МС иМГ, обработанных миелином в течение 24 часов, с последующей инкубацией с ATV:TREM2 в течение 48 часов, показал, что ATV:TREM2 снижает содержание триглицеридов (ТГ) при одновременном увеличении количества промежуточных соединений бета-окисления (ацилкарнитины) и промежуточных соединений цикла Кребса (фиг. 5C-5F). Фиг. 5C представлена тепловая карта, демонстрирующая все соединения ТГ, ацилкарнитина и промежуточные соединения цикла Кребса, которая иллюстрирует кратность изменения $>1,5$ ($p<0,05$), в то время как на фиг. 5D-5F показаны изменения репрезентативных соединений в носителе и простимулированных миелином иМГ, которые инкубировали с ATV:TREM2 или изотипическим контролем после стимуляции. На фиг. 6A-6C показаны изменения специфических соединений ТГ, ацилкарнитина и промежуточных соединений цикла Кребса в иМГ, инкубированных с ATV:TREM2 или изотипическим контролем после стимуляции миелином. Как изображено на фиг. 6A-6C, ATV:TREM2 снижает содержание всех соединений ТГ и церамидов, одновременно повышая содержание некоторых соединений короткоцепочечных ацилкарнитинов, что указывает на то, что ATV:TREM2 может усиливать функцию митохондрий.

Пролиферация микроглиальных клеток связана с активацией и вовлечением сигнала mTOR. Таким образом, была исследована роль ATV:TREM2 в нижележащем сигнальном пути mTOR. Статус фосфорилирования мишеней сигнального пути mTOR анализировали с помощью вестерн-блоттинга на микроглии, образованной из ИПСК дикого типа, инкубированной с репрезентативным вариантом ATV:TREM2 (ATV:TREM2 №3) в присутствии и в отсутствие ингибитора mTOR. На фиг. 7A показаны репрезентативные изображения вестерн-блоттинга мишеней сигнального пути mTOR. Количественная оценка данных вестерн-блоттинга представлена на фиг. 7B-7E (уровни фосфорилирования нормализованы по контролю для нанесения в виде бета-актина). Уровни фосфорилирования для каждого образца, обработанного ATV:TREM2, сравнивали с образцами, обработанными антителом изотипического контроля, для каждого независимого эксперимента ($n=6$). Результаты демонстрируют, что ATV:TREM2 активирует сигнальный путь mTOR, о чем свидетельствуют повышенные уровни фосфорилирования mTOR по серину²⁴⁸⁸, АКТ по серину⁴⁷³, рибосомного белка S6 (RPS6) по серину^{235/236} и GSK3b по серину⁹ в образцах, обработанных ATV:TREM2, относительно изотипических контролей (фиг. 7B-7E; сводная статистика: «н.з.» ($p>0,05$); «*» ($p<0,01$); «***» ($p<0,001$)). RPS6 является мишенью сигнала, расположенной ниже комплекса

mTORC1, а GSK3 β является мишенью сигнала, расположенной ниже комплекса mTORC2. Для всех данных, сгенерированных на фиг. 5А-7Е, изотипический контроль («ИЗО») для ATV:TREM2 №3 содержит последовательности, представленные в таблице 5.

Пример 6. Роль ATV:TREM2 в лизосомальной дисфункции

Была исследована роль ATV:TREM2 в лизосомальной функции. Для оценки воздействия на лизосомальную функцию измеряли уровни програнулина (PGRN) и бис(моноацилглицеро)фосфатов (BMP) в образованных из ИПСК микроглиальных клетках («иМГ»), обработанных вариантом ATV:TREM2.

Чтобы оценить влияние ATV:TREM2 на уровни PGRN, иМГ высевали при плотности 30000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и инкубировали с ATV:TREM2 №3 (100 нМ) в течение 72 часов, после чего клеточный супернатант и клеточный лизат собирали и анализировали на уровни програнулина (PGRN) с использованием колориметрического «сэндвич»-ИФА.

Для измерения уровней PGRN 384-луночные планшеты Maxisorp от Thermo Scientific покрывали захватывающим антителом в концентрации 4 мкг/мл (R&D, антитело к PGRN из набора DuoSet ELISA, кат. № DY2420), разведенным в фосфатно-солевом буфере (PBS) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки для образцов блокировали в течение 90 минут 3% BSA в PBS. Образцы клеток разводили 1:10 в 3% BSA в PBS и добавляли в каждую лунку для образцов на планшете с последующей инкубацией в течение 90 минут при комнатной температуре. Детектирующее антитело (R&D, антитело к PGRN из набора DuoSet ELISA, кат. № DY2420), разбавленное до 125 нг/мл, затем добавляли в каждую лунку с образцом и планшет инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре. Наконец, конъюгированный с HRP стрептавидин (R&D, SA-HRP из набора DuoSet ELISA, кат. № DY2420) разбавляли 1:200 и добавляли в каждую лунку для образца. Планшет инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После промывки лунок с образцами PBS добавляли реагент для визуализации (субстрат ТМВ) и давали прореагировать в течение 5 минут, после чего реакцию останавливали 4 н. H₂SO₄. Поглощение измеряли с помощью планшет-ридера BioTek Synergy Neo2, а уровни PGRN определяли путем интерполяции стандартной кривой, которую аппроксимировали четырехпараметрической логистической кривой. Как проиллюстрировано на фиг. 8, инкубация с ATV:TREM2 повышала уровни PGRN как в супернатанте, так и в клеточном лизате по сравнению с изотипическим контролем.

Чтобы оценить влияние на уровни BMP, иМГ стимулировали миелином или носителем в течение 24 часов с последующей инкубацией с ATV:TREM2 №3 (100 нМ) в течение 48 часов. Клеточные липиды экстрагировали путем добавления метанола,

содержащего смесь внутреннего стандарта, а содержание BMP измеряли с помощью жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) на QTRAP 6500 (SCIEX), аналогичной описанной в международной публикации PCT № WO 2020/112889. Соединения BMP количественно определяли с использованием BMP (14:0_14:0) в качестве внутреннего стандарта и идентифицировали на основе их времени удерживания и свойств MRM. Количественную оценку проводили с использованием MultiQuant 3.02 (Sciex) после поправки на изотопное перекрытие. Соединения BMP были нормализованы к среднему содержанию липидов для всех измеренных соединений. Концентрацию белка измеряли с использованием анализа на основе бицинхониновой кислоты (BCA) (Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс, США). Репрезентативный результат BMP проиллюстрирован на фиг. 9. Как показано на фиг. 9, иМГ, простимулированные миелином и впоследствии обработанные ATV:TREM2, снижают уровни соединений BMP, что предполагает потенциальное избавление от лизосомной стимуляции, индуцированной миелином.

Как проиллюстрировано на фиг. 8 и 9, инкубация иМГ с ATV:TREM2 повышает уровни PGRN и корректирует миелин-индуцированные уровни BMP, указывая на роль ATV:TREM2 в модулировании лизосомальных эффектов. На фиг. 8 и 9 изотипический контроль (ИЗО) для ATV:TREM2 №3 содержит последовательности, представленные в таблице 5.

Пример 7. Роль ATV:TREM2 в митохондриальном дыхании

Для оценки влияния на митохондриальное дыхание потребление кислорода измеряли в образованных из ИПСК микроглиальных клетках («иМГ»), обработанных вариантом ATV:TREM2 или изотипическим контролем, с использованием анализатора Seahorse XFe96 (Agilent) и с использованием материалов и протокола из набора Seahorse XF Palmitate Oxidation Stress Kit (Agilent 103693). Клетки культивировали на микропланшетах XF96 (Agilent, кат. № 102416) с ATV:TREM2 №3 (100 нМ) или изотипическим контролем за 72 часа до эксперимента с использованием Seahorse. Клетки помещали в субстрат-лимитирующую среду, состоящую из Seahorse XF RPMI (Agilent 103576) с добавлением 0,5 мМ глюкозы (Agilent 103577), 1 мМ глутамина (Agilent 103579), 0,5 мМ L-карнитина (часть набора Seahorse XF Palmitate Oxidation Stress Kit) и 1% Hyclone FBS, за 16 часов до эксперимента с использованием Seahorse. В клетки вводили либо конъюгат пальмитат-BSA (166 мкМ), либо контроль BSA непосредственно перед экспериментом. Последовательную инъекцию (1) этомоксира (4 мкМ) (ингибитора карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (CPT1)) или носителя, (2) олигомицина (1,5 мкМ) (ингибитора комплекса V АТФ-синтазы), (3) карбонилцианида 4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP, митохондриальный разобщающий агент, 1

мкМ) и (4) ротенона/антимидина (по 0,5 мМ каждый, ингибиторы комплекса I и комплекса III, соответственно) использовали для оценки дыхательной емкости митохондрий клеток. Скорость потребления кислорода измеряли в ходе эксперимента с помощью анализатора Seahorse (Agilent). Краткое описание экспериментальных условий для оценки митохондриального дыхания представлен в таблице 4.

Таблица 4. Экспериментальные условия

Условие	Антитело	Ингибитор CPT1	Восстанавливающий субстрат
1	Изотипический контроль	Этоксомир	BSA (контроль)
2	ATV:TREM2	Носитель	BSA (контроль))
3	Изотипический контроль	Этоксомир	Пальмитиновая кислота (PAL)
4	ATV:TREM2	Носитель	Пальмитиновая кислота (PAL)
5	Изотипический контроль	Этоксомир	BSA (контроль)
6	ATV:TREM2	Носитель	BSA (контроль))
7	Изотипический контроль	Этоксомир	Пальмитиновая кислота (PAL)
8	ATV:TREM2	Носитель	Пальмитиновая кислота (PAL)

Репрезентативный кинетический график потребления кислорода показан на фиг. 10А, а гистограмма, иллюстрирующая максимальную дыхательную способность клеток, представлена на фиг. 10В. Как показано на фигурах, ATV:TREM2 увеличивает максимальное дыхание в той же степени, что и пальмитиновая кислота, являющаяся субстратом жирных кислот (PAL). Этот эффект уменьшается в присутствии ингибитора CPT1. Результаты демонстрируют, что ATV:TREM2 усиливает максимальное митохондриальное дыхание и что этот эффект, по-видимому, обусловлен повышенной способностью к окислению жирных кислот.

Пример 8. Сравнительные свойства ATV:TREM2

Свойства ATV:TREM2 №1 и ATV:TREM2 №3 сравнивали со свойствами эталонных антител, связывающих TREM2, которые описаны в WO 2019/028292. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи эталонного антитела № 1 («эталон. Ат. №1») представлены SEQ ID NO: 74 и 75, соответственно. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи эталонного антитела № 2 («эталон. Ат. №2») представлены SEQ ID NO: 76 и 75, соответственно. Последовательности тяжелой и легкой цепей для изотипических контролей каждого антитела к TREM2 представлены в таблице 5.

Таблица 5. Последовательности изотипического контроля

Изотипический контроль	Первая тяжелая цепь	Вторая тяжелая цепь	Легкая цепь
ИЗО для эталонных антител №1 и №2	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78
ИЗО для ATV:TREM2 №1	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
ИЗО для ATV:TREM2 №3	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82

ATV:TREM2 более эффективен in vitro и вызывает меньшее воспаление (меньшее высвобождение цитокинов), чем эталонные антитела

Антитела к TREM2 оценивали с использованием анализа выживаемости

макрофагов человека, описанного в примере 4. Фиг. 11А показаны кривые доза-ответ жизнеспособности клеток с антителами к TREM2, где «ИЗО» относится к изотипическому контролю для ATV:TREM2 №3 (таблица 5). Соответствующие значения активности (EC50) и максимального ответа (Emax), определенные по кривым доза-ответ, представлены на фиг. 11В и 11С; отдельные метки представляют отдельные значения от доноров клеток человека (n=3). Результаты, приведенные на фиг. 11А-11С, демонстрируют, что ATV:TREM2 №3 более эффективно способствует выживаемости макрофагов человека *in vitro*, чем эталонные антитела №1 и №2.

В отдельном эксперименте макрофаги человека обрабатывали 100 нМ иммобилизованных на поверхности антител к TREM2 в течение пяти дней, после чего среду для культивирования клеток для каждого набора клеток собирали и анализировали на высвобождение цитокинов с использованием технологии Luminex xMAP и коммерческого набора для мультиплексного анализа на основе частиц (Human Cytokine 42-Plex Discovery Assay®, Eve Technologies Corp.). Тепловая карта относительного уровня высвобождения цитокинов представлена на фиг. 12 (Z-показатель, используемый для построения графика). Результаты на фиг. 12 показывают, что ATV:TREM2 №3 вызывает меньшее воспаление в макрофагах человека, чем эталонные антитела №1 и №2.

Таким образом, ATV:TREM2 №3, эталонное антитело №1 и эталонное антитело №2 способны способствовать выживаемости и пролиферации макрофагов человека (фиг. 11А). Однако ATV:TREM2 №3 демонстрирует более сильную эффективность в отношении выживаемости клеток при уменьшенном общем цитокиновом профиле по сравнению с эталонными антителами №1 и №2 (фиг. 11В, 11С, и 12).

ATV:TREM2 способен снижать уровни триглицеридов после стимуляции

Антитела к TREM2 оценивали с помощью анализа накопления липидов (с использованием 10 мкМ олеиновой кислоты), как описано в примере 4. Результаты для ATV:TREM2 №3, эталонного антитела №1 и эталонного антитела №2 представлены на фиг. 13А-13Е.

На фиг. 13А-13С показаны вулканные диаграммы с пороговым значением $p < 0,05$ и кратностью изменения $> 1,5$ для соединений триглицеридов в образованных из ИПСК микроглиальных клетках («ИМГ»), согласно количественной оценке с помощью ЖХ-МС. Данные нормализованы к изотипическому контролю для каждого антитела. Как показано на фиг. 13А-13С, ATV:TREM2 №3 способен модулировать соединения триглицеридов (ТГ) после введения дозы олеиновой кислоты, в то время как эталонные антитела не вызывали значительного изменения уровней соединений ТГ после введения олеиновой кислоты. На фиг. 13D и 13Е показаны гистограммы для измерений репрезентативных

соединений ТГ, с данными, нормализованными к изотипическому контролю для ATV:TREM2 №3.

ATV:TREM2 способен модулировать уровни TREM2 in vitro

Чтобы оценить, как антитела к TREM2 влияют на уровни TREM2 в образованных из ИПСК микроглиальных клетках («иМГ»), иМГ инкубировали с ATV:TREM2 №3 или эталонным антителом №1 в течение 72 часов при различных концентрациях с последующим измерением уровней TREM2 в лизате клеток иМГ и среде для культивирования клеток. TREM2 измеряли следующим образом. Вкратце, покрытые стрептавидином планшеты MSD с малыми пятнами (Meso Scale Discovery) покрывали биотинилированным поликлональным козьим антителом к hTREM2 (R&D Systems, BAF1828) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты блокировали буфером Block A от MSD (Meso Scale Discovery) на 1 час при комнатной температуре. Образцы и стандарты готовили/разбавляли буфером для анализа (25% буфера Block A от MSD в TBST), и после блокировки в планшет загружали 30 мкл образцов и стандартов. После 1 часа инкубации при комнатной температуре планшеты промывали TBST с последующим связыванием первичного антитела (ATV:TREM2 №3) в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого в планшеты добавляли разбавленное сульфомеченное козье антитело к IgG человека (Southern Biotech, 2049-01) и инкубировали в течение одного 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 TREM2 путем аппроксимации стандартной кривой с помощью программного обеспечения Meso Scale Discovery (Discovery Workbench).

На фиг. 14А и 14В показаны графики зависимости уровней TREM2 от концентрации антител в лизатах клеток иМГ и средах для культивирования клеток после инкубации с антителами к TREM2. Уровни TREM2 для каждого антитела нормализованы к их конкретному изотипическому контролю. На фиг. 14А и 14В, «ИЗО» представляет изотипический контроль для ATV:TREM2 №3. Как проиллюстрировано на фиг. 14А, уровни общего TREM2 увеличивались с увеличением количества антител в лизатах клеток иМГ, обработанных ATV:TREM2 №3 и эталонным антителом №1. Напротив, уровни растворимого TREM2 снижались с увеличением количества антител в культуральной среде клеток, обработанных антителами.

ATV:TREM2 демонстрирует превосходный фармакокинетический профиль у отличных от человека приматов

Фармакокинетические (ФК) свойства антител к TREM2 изучали на отличных от человека приматах. Вкратце, молодым взрослым/взрослым самцам яванских макаков в возрасте от 36 до 53 месяцев внутривенно вводили однократную дозу 30 мг/кг тестируемого препарата (таблица 6, n=5 на когарту). Образцы спинномозговой жидкости собирали через 24, 168 и 336 часов после введения дозы.

Результаты проиллюстрированы в таблице 6 и на фиг. 15. В таблице 6 показаны значения ФК для антител к TREM2 в спинномозговой жидкости (ЦСЖ) отличных от человека приматов. Значения ФК для вариантов ATV:TREM2 демонстрируют, что эти антитела имеют более высокую экспозицию в ЦСЖ по сравнению с Ат к TREM2 (отсутствует способность связывания с рецептором трансферрина; последовательности тяжелой и легкой цепей представлены SEQ ID NO: 83 и 54, соответственно) и эталонным антителом №1.

Таблица 6. Фармакокинетические профили ЦСЖ антител к TREM2 у отличных от человека приматов

Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	C _{max} (нМ)	T _{max} (ч)	AUC _{0-last} (нМ*ч)
ATV:TREM2 №1	30	3,17	24	822,59
ATV:TREM2 №3	30	1,49	24	461,79
ИЗО*	30	3,23	24	618,90
Ат к TREM2	30	0,98	24	280,38
Эталонное антитело №1	30	0,70	24	166,69

* Изотипический контроль для ATV:TREM2 №1

На фиг. 15 показаны фармакокинетические профили для антител к TREM2 в спинномозговой жидкости отличных от человека приматов, которым вводили дозу. Как проиллюстрировано на фиг. 15 и в таблице 6, ATV:TREM2 демонстрирует по меньшей мере 2-кратное увеличение ФК ЦСЖ по сравнению с эталонным антителом №1.

Пример 9. Свойства ATV:TREM2 в гуманизированной мыши TREM2

Для исследования эффектов ATV:TREM2 in vivo мы создали трансгенную мышь ВАС, которая экспрессирует TREM2 человека. Этих мышей скрещивали с мышами с нокаутом по рецептору трансферрина человека, описанными в патенте США № 10143187, чтобы можно было охарактеризовать описанные в данном документе молекулы ATV:TREM2.

Создание трансгенной модели ВАС, экспрессирующей TREM2 человека

Для исследования эффектов ATV:TREM2 in vivo, мы создали несколько линий трансгенных мышей, экспрессирующих TREM2 человека, с использованием модифицированной ДНК ВАС CTD-2210D2 (ThermoFisher Scientific; кат. № 96012). В

исходной ДНК ВАС CTD-2210D2 кодирующая область TREM2 человека и ее регуляторные элементы окружены двумя другими TREM-подобными генами, TREML1 и TREML2. Чтобы избежать интерференции со стороны этих TREM-подобных генов, мы устранили их экспрессию, удалив экзон 1 из TREML1 и экзон 3 из TREML2. Эту сконструированную ДНК-конструкцию ВАС CTD-2210D2 вводили в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток мышей C57BL/6J. Были получены две независимые линии основателей (названные TB36 и TB45), и было показано, что они имеют трансмиссию зародышевой линии.

Чтобы охарактеризовать и сравнить эти две трансгенные линии, для анализа использовали гемизиготных трансгенных животных и нетрансгенных контрольных однопометников дикого типа. Число копий TREM2 человека определяли с помощью анализа хвостовой геномной ДНК методом количественной ПЦР. Уровни мРНК и белка TREM2 человека измеряли в головном мозге, печени, легких и селезенке с помощью кПЦР-РВ и анализа MSD. мРНК TREML1 и TREML2 человека анализировали в отсортированной по мозгу микроглии с помощью кПЦР-РВ. Поверхностную экспрессию TREM2 количественно определяли с помощью FACS в макрофагах костномозгового происхождения (BMDM). Функцию TREM2 человека оценивали с помощью анализа выживаемости BMDM *in vitro*.

TREML1 и TREML2 человека не обнаруживались ни в TB36, ни в TB45, что свидетельствует об успешной делеции этих генов. Анализ методом кПЦР показал наличие двух и одной копии трансгенов TREM2 человека в TB36 и TB45, соответственно, с соответствующей более высокой экспрессией TREM2 человека в TB36 по сравнению с TB45 в головном мозге и периферических тканях. Анализ выживаемости *in vitro* показал, что человеческие агонистические антитела к TREM2 вызывают более сильные ответы в линии TB36, чем в линии TB45.

Основываясь на этой характеристике *ex vivo* и *in vitro*, мы выбрали TB36 для следующих исследований разведения и исследований *in vivo*. Гемизиготных мышей TB36 дополнительно подвергали обратному скрещиванию с C57BL/6J в течение трех раундов, а затем скрещивали с мышами hTfR KI (описанными в патенте США № 10143187) для получения ВАС, гемизиготных по TREM2 человека; мышей, гомозиготных по hTfR KI для исследований *in vivo*.

Фармакокинетические и фармакодинамические ответы на ATV:TREM2 у мышей TB36/hTfR KI

Чтобы определить, может ли ATV:TREM2 вызывать ответ микроглии *in vivo*, однократную дозу ATV:TREM2 №3 или соответствующий изотипический контроль

(ATV:RSV) (100 мг/кг) внутривенно вводили мышам TB36/hTfR KI на 0 день и мышей умерщвляли на 1 или 4 день после введения дозы для анализа *ex vivo*. Во время умерщвления животных подвергали анестезии путем внутрибрюшинной инъекции 2,5% авертина. Терминальный забор крови проводили посредством сердечной пункции в пробирку с ЭДТА с медленным переворачиванием (10 раз) и затем центрифугировали при 15350 g в течение 7 минут при 4°C. Плазму (верхний слой) переносили в пробирку Эппендорфа на 1,5 мл и хранили при -80°C до измерения. После сбора крови образцы спинномозговой жидкости собирали в предварительно вытянутые стеклянные капиллярные пробирки из мозжечково-мозговой цистерны, а затем переносили в пробирки Protein LoBind Eppendorf объемом 0,5 мл для центрифугирования при 12700 об/мин в течение 7 минут при 4°C. Супернатанты образцов спинномозговой жидкости быстро замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до измерения. Затем животных перфузировали холодным PBS, иссекали головной мозг и разделяли два полушария. Правое полушарие мозга фиксировали погружением в 4% параформальдегид при 4°C на 24 часа, а затем переносили в раствор фосфатно-солевого буфера (PBS) с 0,1% азидом натрия для хранения до готовности к обработке 30% сахарозой и изготовления срезов. Левое полушарие мозга разрезали на две части и мгновенно замораживали в двух пробирках для определения ФК и других анализов взаимодействия с мишенью/цитокинов, соответственно.

Уровни человеческого IgG в плазме и головном мозге оценивали через 1 и 4 дня после введения дозы и показаны в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Фармакокинетические профили плазмы и мозга у мышей TB36/hTfR-KI

TB36 * hTfR-KI	Плазма крови		Головной мозг	
	ATV:RSV [hIgG], мкМ	ATV:188-14 [hIgG], мкМ	ATV:RSV [hIgG], нМ	ATV:188-14 [hIgG], нМ
24 часа	2,96 ± 0,17	1,78 ± 0,073	34,1 ± 3,2	24,4 ± 1,6
96 часов	0,401 ± 0,074	0,29 ± 0,013	13,8 ± 1,8	6,67 ± 1,0

Влияние ATV:TREM2 на пролиферацию микроглии

Четыре дозы 5-этинил-2'-дезоксисуридина (EdU, 80 мг/кг), аналога тимидина, который может быть включен во вновь синтезированную ДНК, вводили мышам внутрибрюшинно на 0 день, 1 день, 2 день и 3 день после лечения ATV:TREM2 №3 или ATV:RSV на 0 день.

Для обнаружения пролиферирующей микроглии (EdU+Iba1+) срезы головного мозга на 4-й день после введения дозы обрабатывали наборами для визуализации Click-iT EdU (ThermoFisher Scientific, C10637) с последующим иммуноокрашиванием Iba1.

Окрашивание EdU-Iba1 показало, что ATV:TREM2 резко увеличивает количество неонатальной микроглии (EdU+ Iba1+; фиг. 16A) и общую площадь покрытия микроглией (Iba1+ площадь; фиг. 16B) в головном мозге по сравнению с изотипическим контролем, таким образом демонстрируя, что ATV:TREM2 значительно увеличивает пролиферацию микроглии по сравнению с контролем.

ATV:TREM2 значительно более эффективен в отношении пролиферации микроглии по сравнению с антителами, отличными от ATV TREM2, в мышинной модели

Чтобы определить наименьшую эффективную дозу ATV:TREM2 и сравнить с антителами, отличными от ATV TREM2, однократная доза ATV:TREM2 №3 (1, 3, 10, 30 мг/кг) или соответствующего эталонного антитела к TREM2 («Ат к TREM2»; 30 мг/кг), эталонного антитела №2 (30 мг/кг) или изотипического контроля (ATV:RSV; 30 мг/кг) вводили внутривенно мышам TB36/hTfR KI на 0 день. Для измерения пролиферации микроглии мышам внутрибрюшинно вводили EdU на 0 день, 1 день, 2 день и 3 день после лечения антителами. Мышей забирали на 1 и 4 день для анализа. Двойное окрашивание EdU-Iba1 демонстрирует дозозависимое увеличение неонатальной микроглии с 1 мг/кг до 10 мг/кг у животных, которым вводили ATV:TREM2, на 4-й день, при этом 10 мг/кг ATV:TREM2 демонстрировали максимальный эффект на пролиферацию микроглии (фиг. 17A и 17B). Кроме того, эффект 1 мг/кг ATV:TREM2 на пролиферацию микроглии немного выше (статистически незначимо), чем либо антителом к TREM2, либо эталонным антителом №2, несмотря на 30-кратное увеличение дозировки.

ATV:TREM2 транзистентно повышает уровень цитокинов в головном мозге у мышей TB36/hTfR KI

Чтобы определить влияние ATV:TREM2 на уровни цитокинов (например, хемокинов), уровни цитокинов измеряли в терминальных лизатах плазмы и мозга (приготовленных при помощи буфера для лизиса Cell Signaling № 9803) мышей TB36/hTfR KI с использованием панели мышинных цитокинов/хемокинов 44-Plex (MD44). Мы обнаружили, что лечение ATV:TREM2 №3 не изменило уровни цитокинов, измеренные в плазме, но резко повысило уровни некоторых цитокинов (например, IP-10 и MCP-5), измеренные в головном мозге через 24 часа после введения дозы, и эти уровни цитокинов восстанавливались до исходного уровня через 96 часов после введения дозы. ATV:TREM2 №3 в дозе 3 мг/кг оказывал максимальное влияние на уровни цитокинов в головном мозге (фиг. 18A и 18B).

ATV:TREM2 повышает уровень CSF1R в головном мозге у мышей TB36/hTfR KI

Чтобы определить влияние ATV:TREM2 на уровень глиального маркера CSF1R, уровень белка CSF1R измеряли в лизатах головного мозга (приготовленных при помощи

буфера для лизиса Cell Signaling №9803) мышей TB36/hTfR KI с использованием коммерческого набора для ИФА (Abcam ab240681). Мы обнаружили, что увеличение дозы ATV:TREM2 №3 приводило к повышению уровня белка CSF1R через 1 день после лечения и через 4 дня после лечения (фиг. 19).

ФК профиль ATV:TREM2 в плазме

Пропорциональное увеличение ФК в плазме наблюдалось при дозах ATV:TREM2 №3 в диапазоне от 1 мг/кг до 100 мг/кг. Через 24 часа концентрации в плазме соответствующих доз в 30 мг/кг ATV:TREM2 №3, эталонного антитела №2 и Ат к TREM2 существенно не отличались. Эталонное антитело № 2, по-видимому, имело более низкий клиренс по сравнению с ATV:TREM2 №3 и Ат к TREM2 в той же дозе (фиг. 20).

ФК профиль ATV:TREM2 в головном мозге

Через 24 часа концентрация в головном мозге 10 мг/кг ATV:TREM2 №3 была аналогична Ат к TREM2 в дозе 30 мг/кг, а концентрация в головном мозге 1-3 мг/кг ATV:TREM2 №3 была аналогична эталонному антителу № 2 в дозе 30 мг/кг. Более чем пропорциональное увеличение наблюдалось при дозах от 3 мг/кг до 10 мг/кг ATV:TREM2 №3, а пропорциональное увеличение наблюдалось при других дозах. Через 96 часов концентрация 10 мг/кг ATV:TREM2 №3 в головном мозге была аналогична концентрации Ат к TREM2 и эталонного антитела №2 в дозе 30 мг/кг (фиг. 21). В целом, поглощение мозгом ATV:TREM2 №3 более эффективно, чем Ат к TREM2 и эталонного антитела №2.

Таблица 8. Неофициальный перечень последовательностей

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
1	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCP DSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLS FLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQ SLHGSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESE SFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIFLIKILAA SALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPG LRDT	Белок TREM2 человека
2	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWI RQPPGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISR DNTQNILYLQMNTLRAEDTAIYYCARLSYGFDYWGQ GVMVTVSS	V _H CL0020306
3	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLHSNGKTYL NWYLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTD FTLKISSVEAEDVGVYYCQQFLEFPFTFGSGTKLEIK	V _L CL0020306

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
4	GFTFTDFYMS	CDR-H1 CL0020306; CDR-H1 CL0020164; 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	ARLSYGFDY	CDR-H3 CL0020306
7	QSSKSLHNSNGKTYLN	CL0020306 CDR-L1; CL0020164 CDR-L1; CL0020307 CDR-L1; CL0020307-1 CDR-L1; 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 CL0020164; 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	EVKLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNFYMSWIR QPPGRAPEWLGVIRNRPNGYTTDYNPSVKGRFTISRDN TQNILYLQMSTLRADDTAFYYCTRLTYGFDYWGGV MVTVSS	V _H CL0020307
11	DIVMTQGALPNVPSPGESASITCQSSKSLHNSNGKTYL NWYLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTD FTLKISSVEAEVVGVIYCQQFLEFPFTFGSGTKLEIK	V _L CL0020307
12	GFTFTNFYMS	CDR-H1 CL0020307
13	VIRNRPNGYTTDYNPSVKG	CDR-H2 CL0020307
14	TRLTYGFDY	CDR-H3 CL0020307

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
15	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWI RQPPGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISR DNTQNILYLQMNLTLEAEDTAIYYCARLTYGFDYWGQ GVMVTVSS	V _H CL0020188
16	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLHNSNGKTYL NWYLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTD FTLKISSVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGSGTKLEIK	V _L 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; CDR-H3 CL0020164
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	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSS	V _H CL0020188-1; V _H CL0020188-3
20	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCQSSKSLHNSNGKTYLN WYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVDPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGKVEIK	V _L CL0020188-1; V _L CL0020188-2; V _L CL0020188-5; V _L CL0020188-6
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSS	V _H CL0020188-2; V _H CL0020188-4
22	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCQSSKSLHSTGKTYLN WYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVDPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGKVEIK	V _L CL0020188-3; V _L CL0020188-4; V _L CL0020188-7; V _L CL0020188-8
23	QSSKSLHSTGKTYLN	CDR-L1 для вариантов CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-7, и CL0020188-8
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSS	V _H CL0020188-5; V _H CL0020188-7

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
25	VIRNKANAYTAGYNPSVKG	CDR-H2 для вариантов CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, и CL0020188-8
26	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAGSGFTFTDFYMSWV RQAPGKGPEWLSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSS	V _H CL0020188-6; V _H CL0020188-8
27	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQSSKSLHLSNGKTYL NWKYQQKPGQPPKLLIYWMSSTRASGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQFLEFPFTFGQGTKVEIK	V _L CL0020307-1
28	G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S, где α_6 представляет собой D или N	Консенсусная последовательность CDR-H1
29	V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G, где β_5 представляет собой K или R; β_6 представляет собой A или P; β_8 представляет собой G или A; β_{11} представляет собой A или T; и β_{12} представляет собой G или D	Консенсусная последовательность CDR-H2
30	γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y, где γ_1 представляет собой A или T; и γ_4 представляет собой T или S	Консенсусная последовательность CDR-H3
31	Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N, где δ_{10} представляет собой N или T	Консенсусная последовательность CDR-L1
32	Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T, где ϕ_6 представляет собой Y или F	Консенсусная последовательность CDR-L3
33	000	
34	GGGGS	Последовательность линкера
35	HHHHHH	Метка 6X-His
36	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Константный домен тяжелой цепи 1 (CH1)
37	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Константный домен легкой цепи (CL)
38	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc человека дикого типа положения 231-447 в соответствии со схемой нумерации EU
39	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc с мутациями типа «впадина», LALA и LS

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
40	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVW WESYGTEWSSYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEW QQGFVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон 35.21
41	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV WWESYGTEWSSYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc клона CH3C.35.21 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVS VIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVWESYGTEWSSYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти- TREM2/CH35.21 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
43	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESFGTEWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEW QQGFVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.1.1
44	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESFGTEWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc клона CH3C.35.23.1.1 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVS VIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESFGTEWSNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти- TREM2/CH35.23.1.1 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
46	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESYGTEWVNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKEEW QQGFVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
47	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc CH3C.35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
49	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4
50	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.23.4 с мутациями типа «выступ», LALA и LS
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти-TREM2 с мутациями типа «впадина» и LS

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти- TREM2 с мутациями «впадина», LALA и LS
54	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCQSSKSLHSTGKTYLN WYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь анти- TREM2
55	NSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVH ANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANA SLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYT PGFPSFNHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFNM EGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVCLTVS	Апикальный домен Tfr человека
56	GGGGSGGGGS	Линкер
57	DKTHTCPPCP	Часть шарнирной последовательности IgG1 человека
58	YxTEWSS	Мотив CH3 (Tfr- связывающий)
59	TxxExxxxF	Мотив CH3 (Tfr- связывающий)
60	MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVE MKLGVDDEENTDNNTKANGTKPKRCGGNICYGTIAVII FFLIGFMIGYLGCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLY VPREAGSQKDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFKV IQVKDSAQNSVIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSkaa TVTGLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITF AEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAH LGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVCLTVS NVLKETKILNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPG AAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASW SAGDFGSGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLG TSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPY LGTMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLT HDTELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSL QWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLN DRVMRVEYYYFLSPYVSPKESPFRRHVFWGSGSHTLSALL ESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALS GDVWDIDNEF	Tfr яванского макака

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
61	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Полипептид Fc с мутациями типа «впадина» и LS
62	MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVE MKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVI VFFLIGFMIGYLGKYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEP GEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTGTLKLLNE NSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQ HFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY SKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRA GKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFF GHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSSLNIPVQTIS RAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSESKNVK LTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW GPGAAGSGVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIF ASWSAGDFGSGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKA VLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQ DSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTD YPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGL SLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKL NDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFHVFWGSGSHTLPA LLENLKLKRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANA LSGDVWDIDNEF	Белок трансферринового рецептора 1 (TFR1) человека
63	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc с мутациями типа «впадина», LALA и LS, укороченный
64	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV WWESYGTEWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc клона CH3C.35.21 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченный
65	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVS VIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVWWESYGTEWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.21 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченная

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
66	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESFGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc клона CH3C.35.23.1.1 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченный
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESFGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.23.1.1 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченная
68	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESYGTEWVNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc CH3C.35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченный
69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESYGTEWVNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.23.3 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченная
70	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESYGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEE WQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc CH3C.35.23.4 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченный
71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESYGTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти-TREM2/CH35.23.4 с мутациями типа «выступ», LALA и LS, укороченная

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти- TREM2 с мутациями типа «выступ» и LS, укороченная
73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Тяжелая цепь анти- TREM2 с мутациями «впадина», LALA и LS, укороченная
74	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFSSQWMN WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTITA DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLLRNQPGESYA MDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQK SLSLSPGK	Тяжелая цепь эталонного антитела №1
75	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVHSNRYTYL HWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь эталонного антитела №1 и №2

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
76	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSSQWMN WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTITA DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLLRNQPGESYA MDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHGHALHNHYTQK SLSLSPGK	Тяжелая цепь эталонного антитела №2
77	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Изотипический контроль эталонных антител № 1 и № 2, тяжелая цепь
78	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQK PGQAPRLLIYDTSNLAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFAVYYCQQWSSYPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	Изотипический контроль эталонных антител № 1 и № 2, легкая цепь
79	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGVW IRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTS KNQVVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWG AGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVWVESYGTEWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVTKKEWQQGFVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	Изотипический контроль для ATV:TREM2 №1, тяжелая цепь с выступом, LALA

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
80	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGW IRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTS KNQVVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWG AGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVTKEEWQQGFVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK	Изотипический контроль для ATV:TREM2 №3, тяжелая цепь с выступом, LALA
81	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGW IRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTS KNQVVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWG AGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K	Изотипический контроль для ATV:TREM №1 и №3, тяжелая цепь с впадиной, LALA
82	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQ KPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCFQGSQYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Изотипический контроль для ATV:TREM2 №1 и №3, легкая цепь
83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWV RQAPGKGLEWVS VIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь анти-TREM2 с мутациями LALA
84	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Полипептид Fc с мутациями типа «впадина» и LS, укороченный

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(a) вариабельную область, содержащую:

i. последовательность CDR-H1, включающую последовательность G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), где α_6 представляет собой D или N;

ii. последовательность CDR-H2, включающую последовательность V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), где β_5 представляет собой K или R; β_6 представляет собой A или P; β_8 представляет собой G или A; β_{11} представляет собой A или T; и β_{12} представляет собой G или D;

iii. последовательность CDR-H3, включающую последовательность γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), где γ_1 представляет собой A или T; и γ_4 представляет собой T или S;

iv. последовательность CDR-L1, включающую последовательность Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), где δ_{10} представляет собой N или T;

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

vi. последовательность CDR-L3, включающую последовательность Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T (SEQ ID NO:32), где ϕ_6 представляет собой Y или F;

(b) первый полипептид Fc, модифицированный для специфического связывания с рецептором трансферрина; и

(c) второй полипептид Fc.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что последовательность CDR-H1 выбрана из SEQ ID NO:4 или 12.

3. Антитело по п. 1 или 2, отличающееся тем, что последовательность CDR-H2 выбрана из SEQ ID NO: 5, 13 или 25.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что последовательность CDR-H3 выбрана из SEQ ID NO:6, 14 или 17.

5. Антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что последовательность CDR-L1 выбрана из SEQ ID NO:7 или 23.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что последовательность CDR-L3 выбрана из SEQ ID NO:9 или 18.

7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что вариабельная область

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

(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; или

8. Антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что переменная область содержит последовательность V_H , которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24 и 26.

9. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что последовательность V_H имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

10. Антитело по п. 9, отличающееся тем, что последовательность V_H имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15.

11. Антитело по п. 10, отличающееся тем, что последовательность V_H включает SEQ ID NO:15.

12. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что последовательность V_H имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:24.

13. Антитело по п. 12, отличающееся тем, что последовательность V_H имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:24.

14. Антитело по п. 13, отличающееся тем, что последовательность V_H включает SEQ ID NO:24.

15. Антитело по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что переменная область содержит последовательность V_L , имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 3, 11, 16, 20, 22 и 27.

16. Антитело по п. 15, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16.

17. Антитело по п. 16, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16.

18. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что последовательность V_L включает SEQ ID NO:16.

19. Антитело по п. 15, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по

меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22.

20. Антитело по п. 19, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22.

21. Антитело по п. 20, отличающееся тем, что последовательность V_L включает SEQ ID NO:22.

22. Антитело по п. 15, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27.

23. Антитело по п. 22, отличающееся тем, что последовательность V_L имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:27.

24. Антитело по п. 23, отличающееся тем, что последовательность V_L включает SEQ ID NO:27.

25. Антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что переменная область 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:21, 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:27.

26. Антитело по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит: Trp, Leu или Glu в положении 380; Tyr или Phe в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ser, Ala или Val в положении 389; Ser или Asn в положении 390; Thr или Ser в положении 413; Glu или Ser в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421 согласно нумерации EU.

27. Антитело по п. 26, отличающееся тем, что первый полипептид Fc связывается с апикальным доменом рецептора трансферрина.

28. Антитело по п. 26 или п. 27, отличающееся тем, что антитело имеет улучшенное поглощение мозгом по сравнению с антителом, имеющим димер Fc дикого типа.

29. Антитело по любому из пп. 1-28, отличающееся тем, что первый полипептид Fc имеет замену T366W, а второй полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU.

30. Антитело по любому из пп. 1-28, отличающееся тем, что первый полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc имеет замену T366W согласно нумерации EU.

31. Антитело по любому из пп. 1-30, отличающееся тем, что первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат модификацию, которая снижает эффекторную функцию.

32. Антитело по п. 31, отличающееся тем, что модификация, которая снижает эффекторную функцию, включает замены Ala в положении 234 и Ala в положении 235 в соответствии с нумерацией EU.

33. Антитело по любому из пп. 1-32, отличающееся тем, что первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат аминокислотные модификации по сравнению с нативной последовательностью Fc, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

34. Антитело по п. 33, отличающееся тем, что аминокислотные модификации включают замены Leu в положении 428 и Ser в положении 434 согласно нумерации EU.

35. Антитело по любому из пп. 1-34, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:41 или SEQ ID NO:64, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63.

36. Антитело по п. 35, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:41;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

37. Антитело по п. 35, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:64;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

38. Антитело по п. 35 или п. 36, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:42;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

39. Антитело по п. 35 или п. 37, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:65;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

40. Антитело по любому из пп. 1-34, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:66, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63.

41. Антитело по п. 40, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:44;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

42. Антитело по п. 40, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:66;
- (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и
- (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

43. Антитело по п. 40 или п. 41, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45;
- (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и
- (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

44. Антитело по п. 40 или п. 42, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:67;
- (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и
- (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

45. Антитело по любому из пп. 1-34, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:68, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63.

46. Антитело по п. 45, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47;
- (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и
- (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

47. Антитело по п. 45, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68;
- (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

48. Антитело по п. 45 или п. 46, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

49. Антитело по п. 45 или п. 47, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

50. Антитело по любому из пп. 1-34, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:68, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:61 или SEQ ID NO:84.

51. Антитело по п. 50, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

52. Антитело по п. 50, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:84; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

53. Антитело по п. 50 или п. 51, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной

последовательности, указанной в SEQ ID NO:52; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

54. Антитело по п. 50 или п. 52, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

55. Антитело по любому из пп. 1-34, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:50 или SEQ ID NO:70, а второй полипептид Fc содержит последовательность SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:63.

56. Антитело по п. 55, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:50;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

57. Антитело по п. 55, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:70;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

58. Антитело по п. 55 или п. 56, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:51;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

59. Антитело по п. 55 или п. 57, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной

последовательности, указанной в SEQ ID NO:71;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

60. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:41;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

61. Антитело по п. 60, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:42;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

62. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:64;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

63. Антитело по п. 62, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:65;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит

из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

64. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:44;
- (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:39; и
- (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

65. Антитело по п. 64, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45;
- (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и
- (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

66. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:66;
- (ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид F_c , включающий SEQ ID NO:63; и
- (iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

67. Антитело по п. 66, содержащее:

- (i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:67;
- (ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и
- (iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

68. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

69. Антитело по п. 68, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

70. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

71. Антитело по п. 70, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

72. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:47

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

73. Антитело по п. 72, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:48;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:52; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

74. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:68;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:61; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

75. Антитело по п. 74, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:69;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

76. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:50;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:39; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

77. Антитело по п. 76, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:51;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:53; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

78. Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором человека, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), причем антитело содержит:

(i) первую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и первый полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:70;

(ii) вторую тяжелую цепь (HC), содержащую V_H , включающую SEQ ID NO:24, и второй полипептид Fc, включающий SEQ ID NO:63; и

(iii) две легкие цепи, каждая из которых содержит V_L , включающую SEQ ID NO:22.

79. Антитело по п. 78, содержащее:

(i) первую тяжелую цепь (HC), которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:71;

(ii) вторую HC, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:73; и

(iii) первую и вторую легкую цепь (LC), каждая из которых содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:54.

80. Антитело по любому из пп. 1-79, отличающееся тем, что антитело снижает уровни растворимого белка TREM2 (sTREM2).

81. Антитело по любому из пп. 1-80, отличающееся тем, что антитело усиливает активность TREM2.

82. Антитело по любому из пп. 1-81, отличающееся тем, что антитело усиливает фагоцитоз или усиливает миграцию, дифференцировку, функцию или выживаемость миелоидных клеток, микроглии или макрофагов.

83. Антитело по любому из пп. 1-82, отличающееся тем, что антитело усиливает функцию микроглии без усиления нейровоспаления.

84. Антитело по любому из пп. 1-83, отличающееся тем, что антитело усиливает фосфорилирование Syk.

85. Антитело по п. 84, отличающееся тем, что антитело усиливает фосфорилирование Syk в присутствии лиганда TREM2.

86. Антитело по любому из пп. 1-85, отличающееся тем, что антитело проявляет перекрестную реактивность с белком TREM2 яванского макака.

87. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по любому из пп. 1-86 и фармацевтически приемлемый носитель.

88. Набор, содержащий:

выделенное антитело по любому из пп. 1-86 или фармацевтическую композицию по п. 87; и

инструкции по их применению.

89. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту выделенного антитела по любому из пп. 1-86 или фармацевтической композиции по п. 87.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что 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 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), болезни Хантингтона, миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу-Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, болезни Ниманна-Пика типа С, паллидопонтонигральной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками.

91. Способ снижения уровней sTREM2 у субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, включающий введение субъекту выделенного антитела по любому из пп. 1-86 или фармацевтической композиции по п. 87.

92. Способ усиления активности TREM2 у субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, включающий введение субъекту выделенного антитела по любому из пп. 1-86 или фармацевтической композиции по п. 87.

93. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп. 1-86.

94. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из SEQ ID NO:42, 45, 48, 51, 53, 54 и 61.

95. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:42, 53 и 54.

96. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:45, 53 и 54.

97. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:48, 53 и 54.

98. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:48, 52 и 54.

99. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:51, 53 и 54.

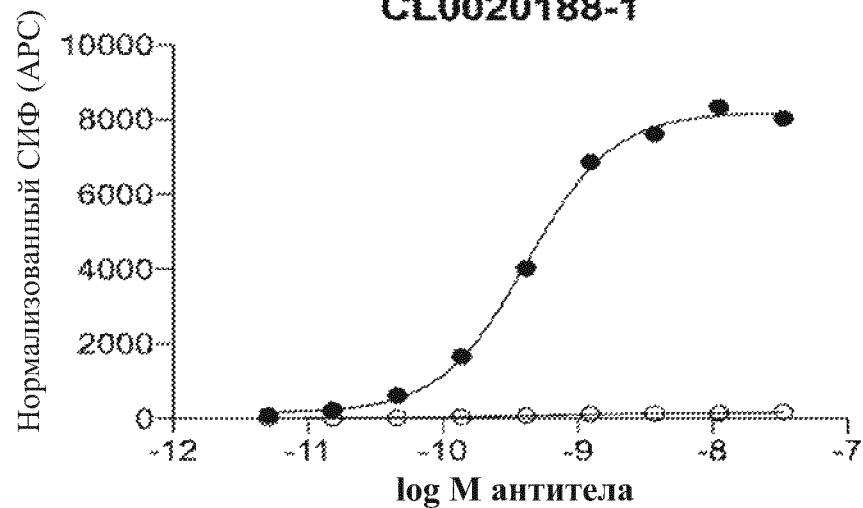
100. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 93-99.

101. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 93-99 или вектор по п. 100.

102. Способ экспрессии антитела, которое специфически связывается с человеческим триггерным рецептором, экспрессируемым на миелоидных клетках-2 (TREM2), включающий: культивирование клетки-хозяина по п. 101 в условиях, подходящих для экспрессии антитела.

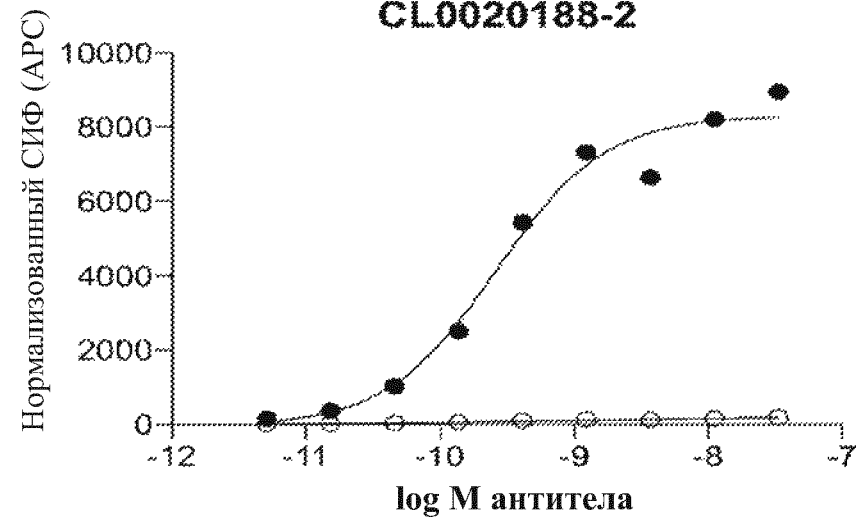
Фиг. 1А

CL0020188-1



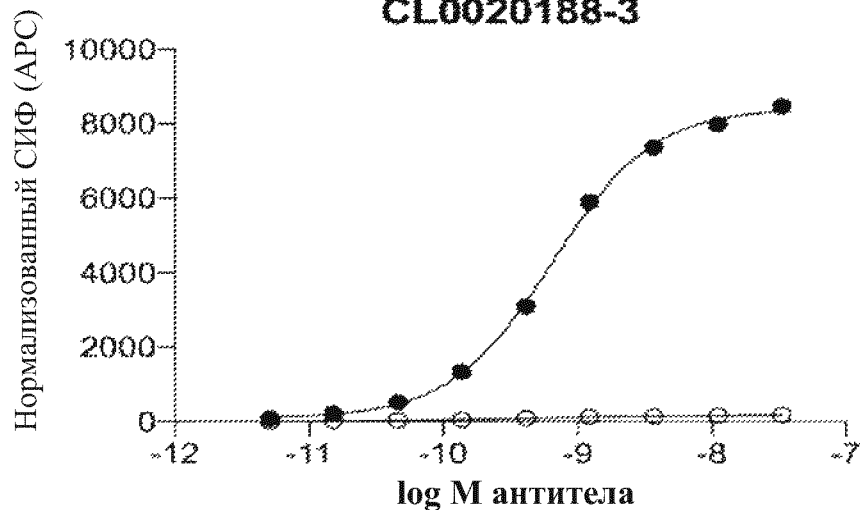
Фиг. 1В

CL0020188-2



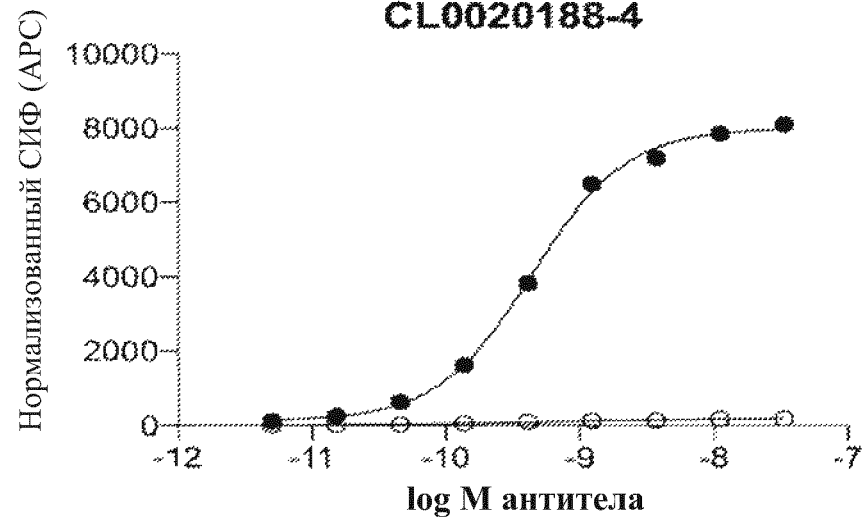
Фиг. 1С

CL0020188-3



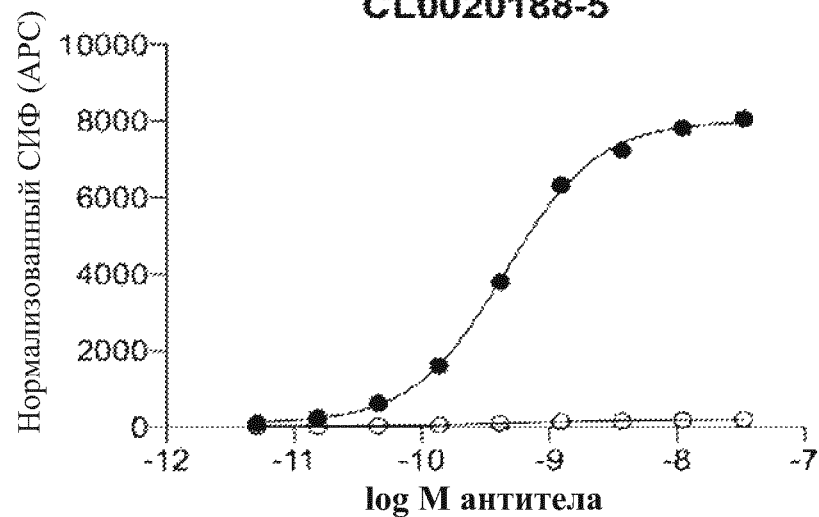
Фиг. 1D

CL0020188-4



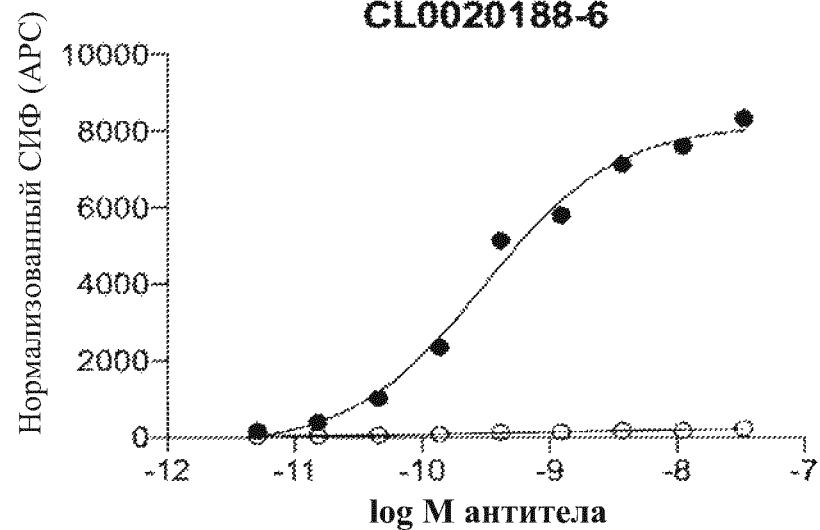
Фиг. 1Е

CL0020188-5



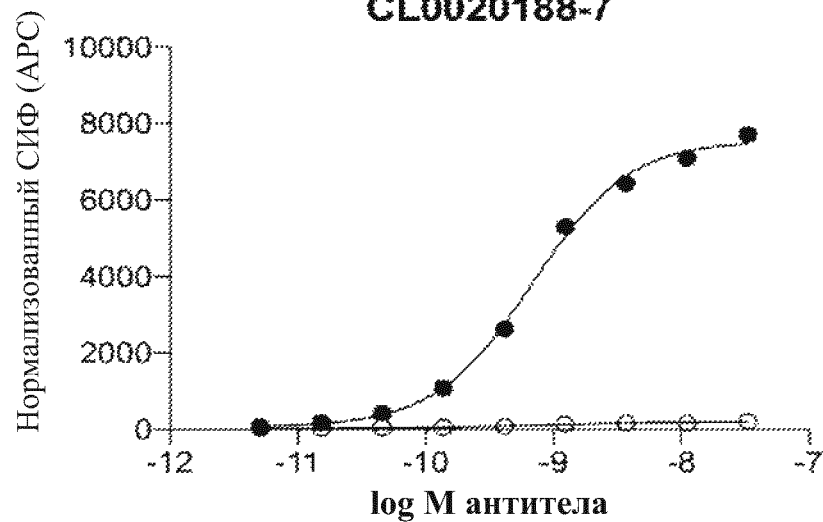
Фиг. 1F

CL0020188-6



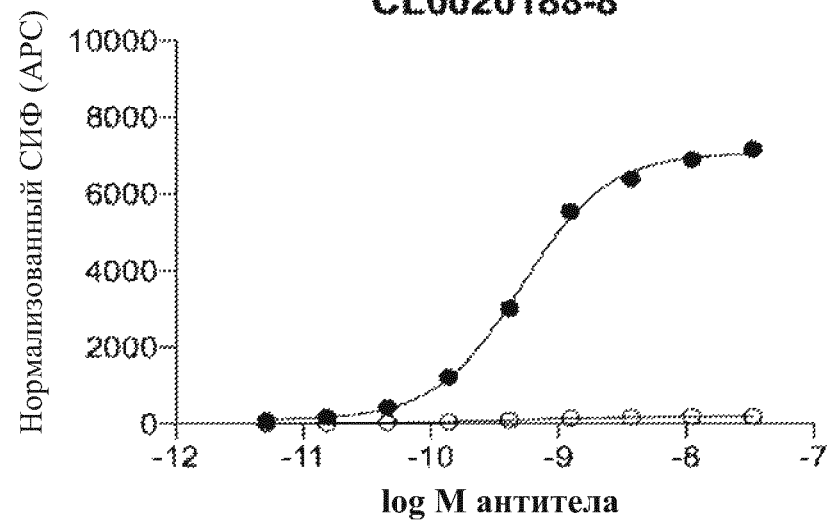
Фиг. 1G

CL0020188-7



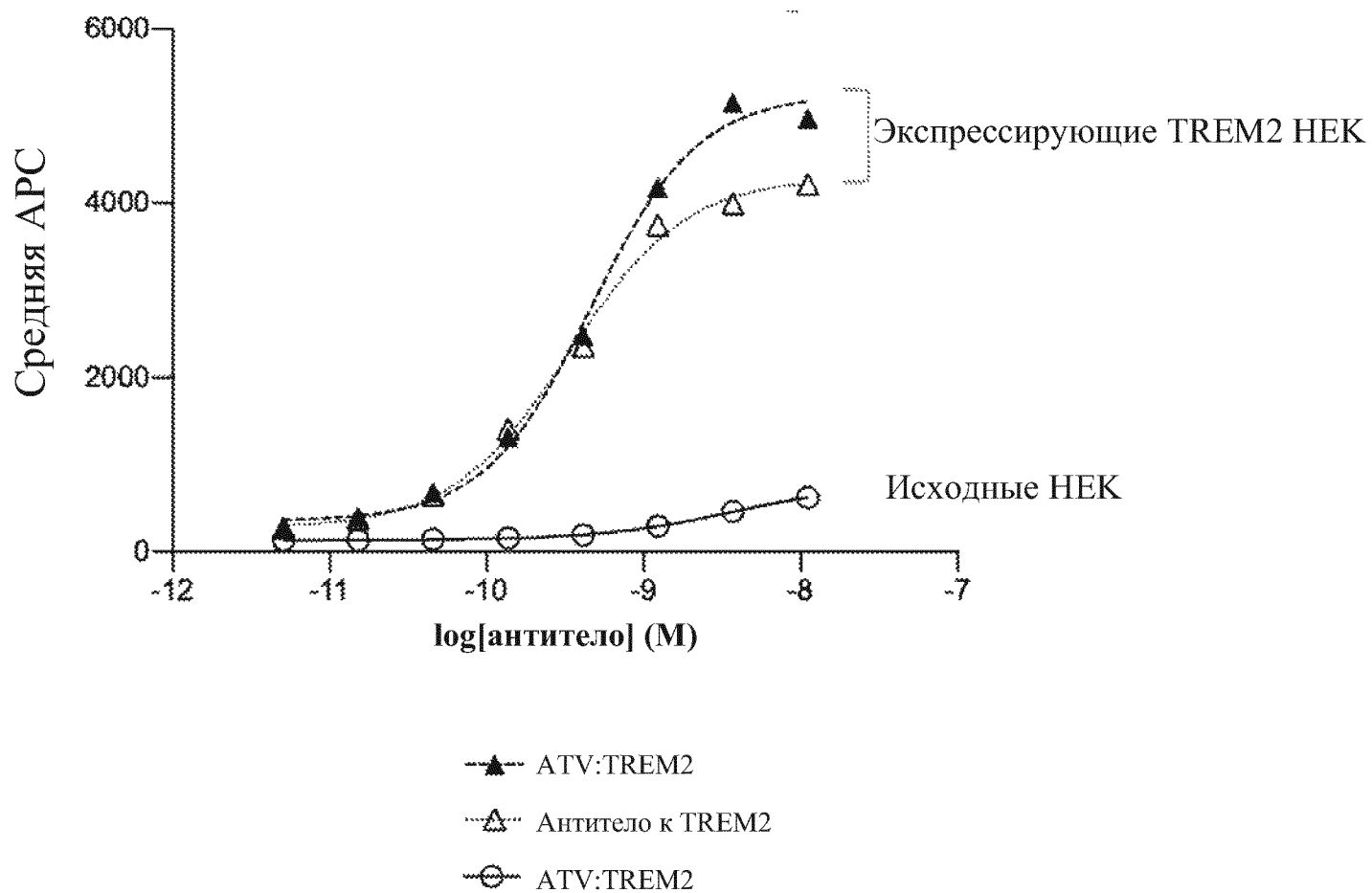
Фиг. 1H

CL0020188-8



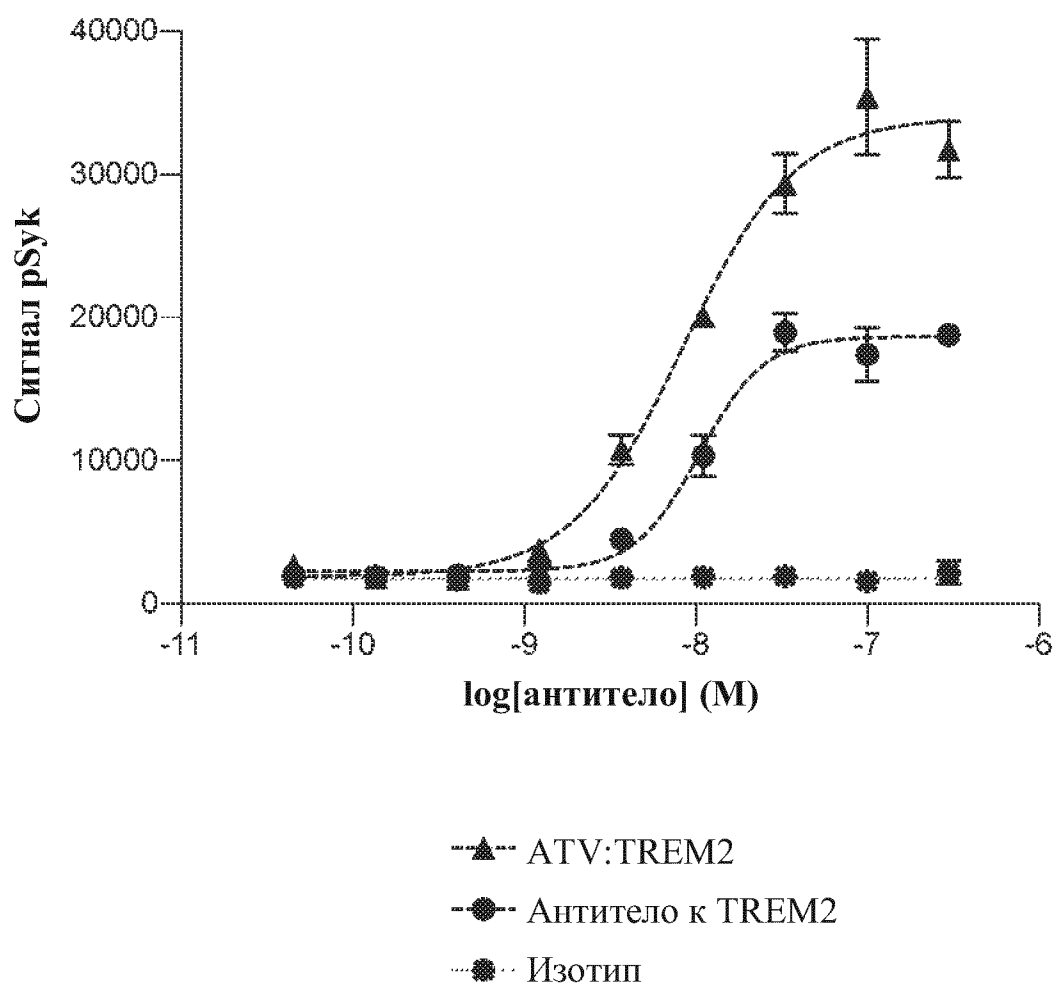
Фиг. 2

Связывание клеток НЕК



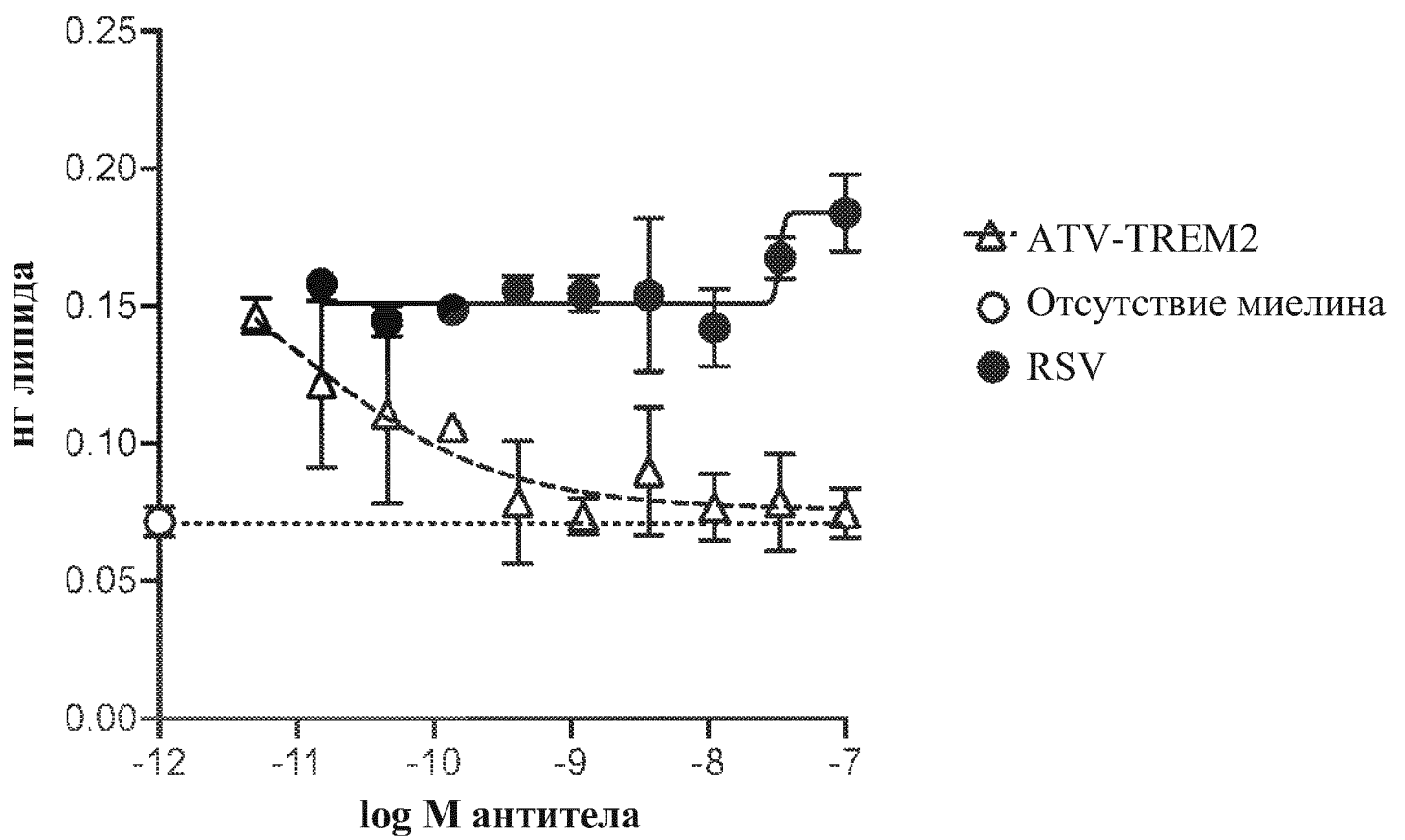
Фиг. 3

Сигналинг pSYK в НЕК, экспрессирующем TREM2

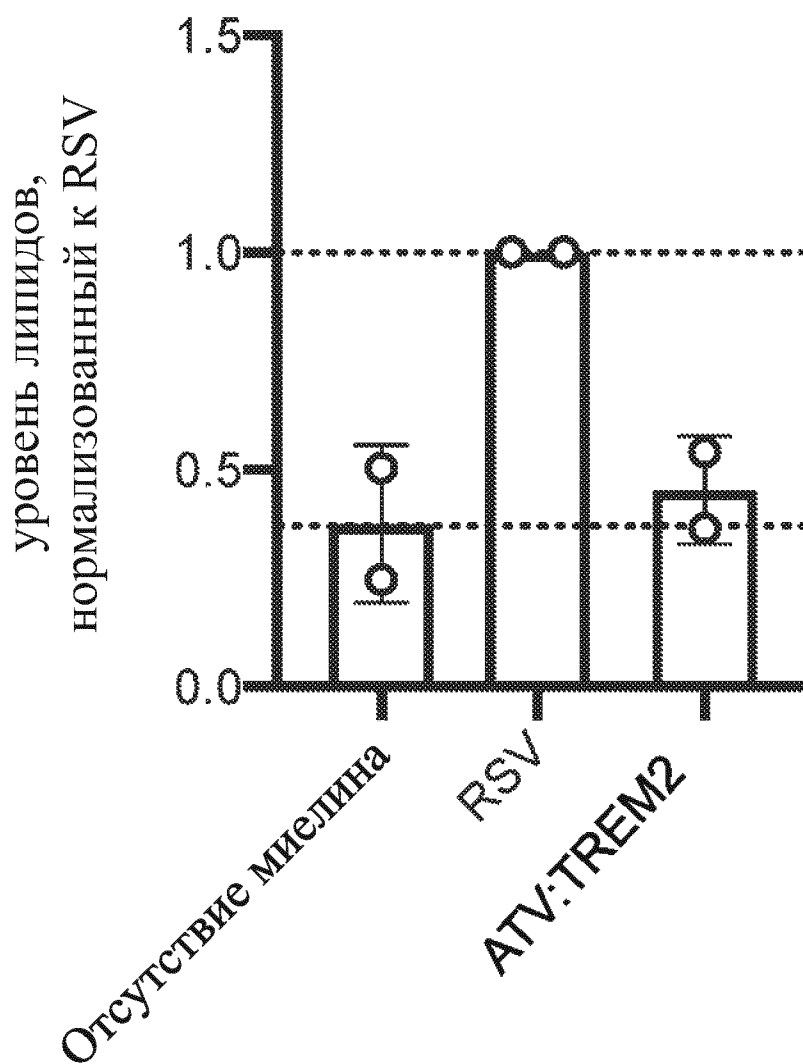


Фиг. 4А

ATV:TREM2

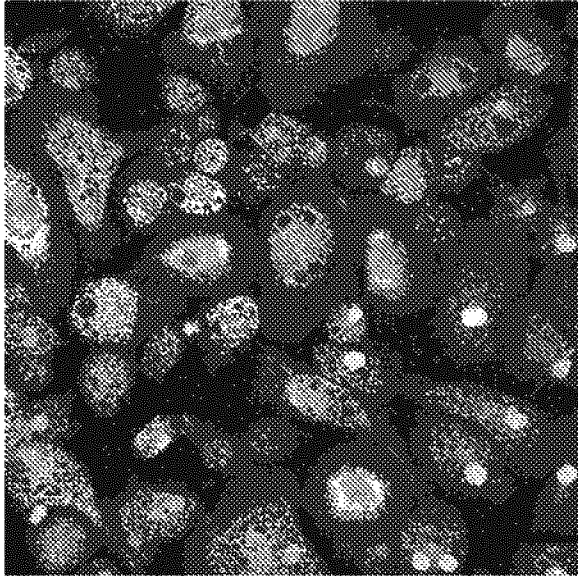


Фиг. 4В

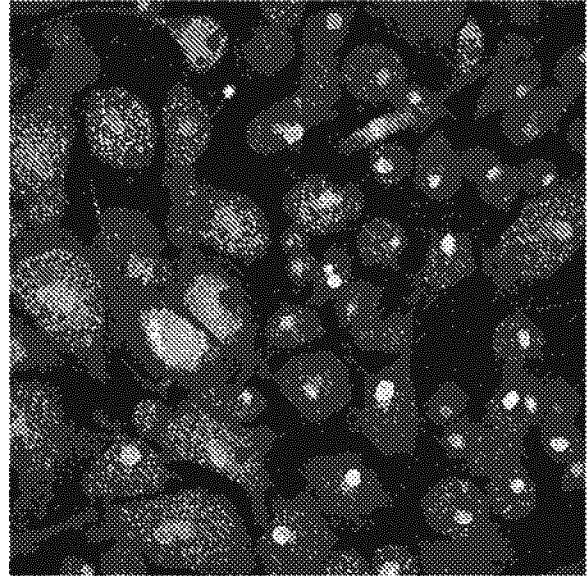
Триацилглицерид 56:4/20:4
10 нМ антитела

Фиг. 5А

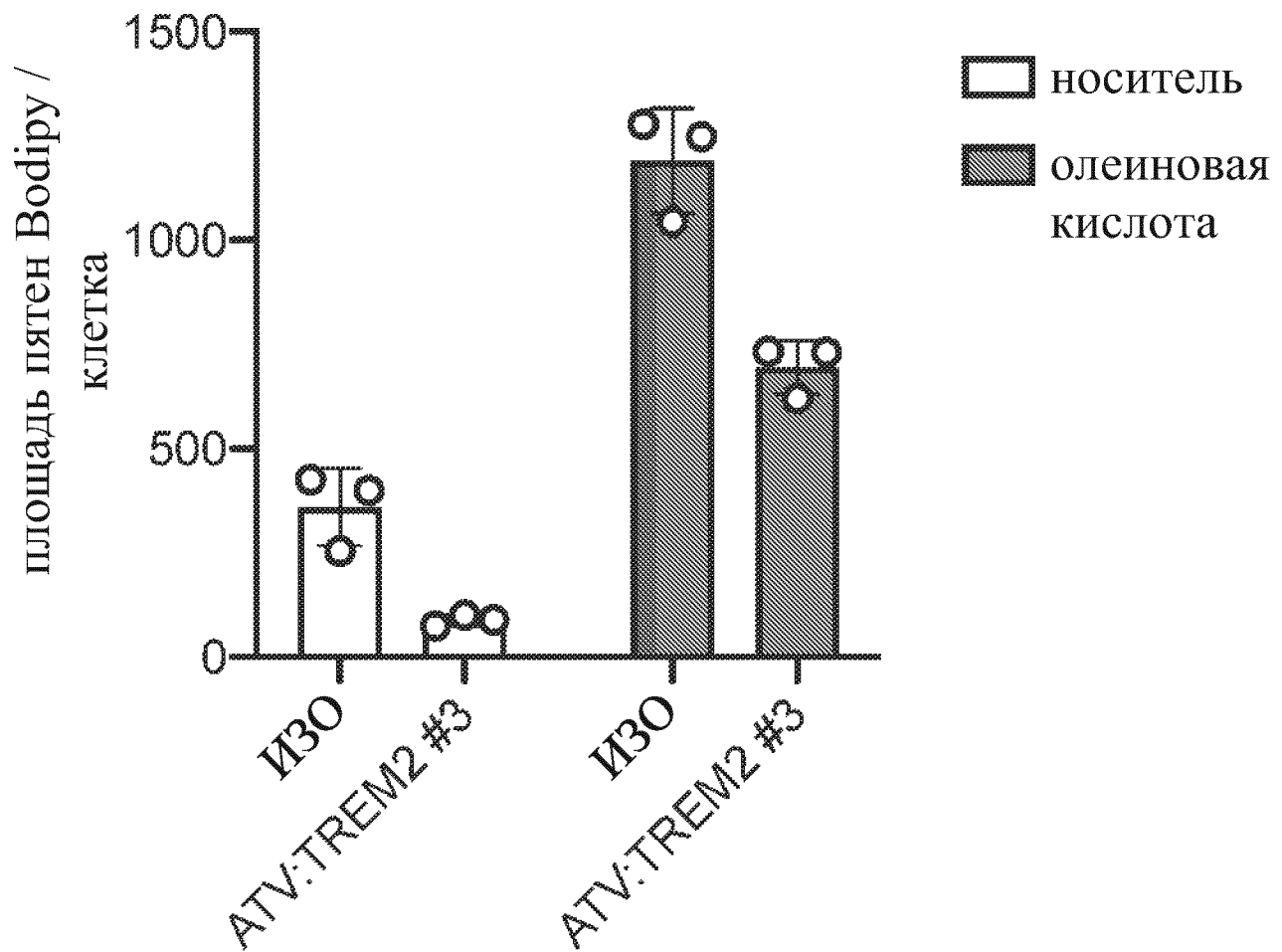
ATV:Контроль



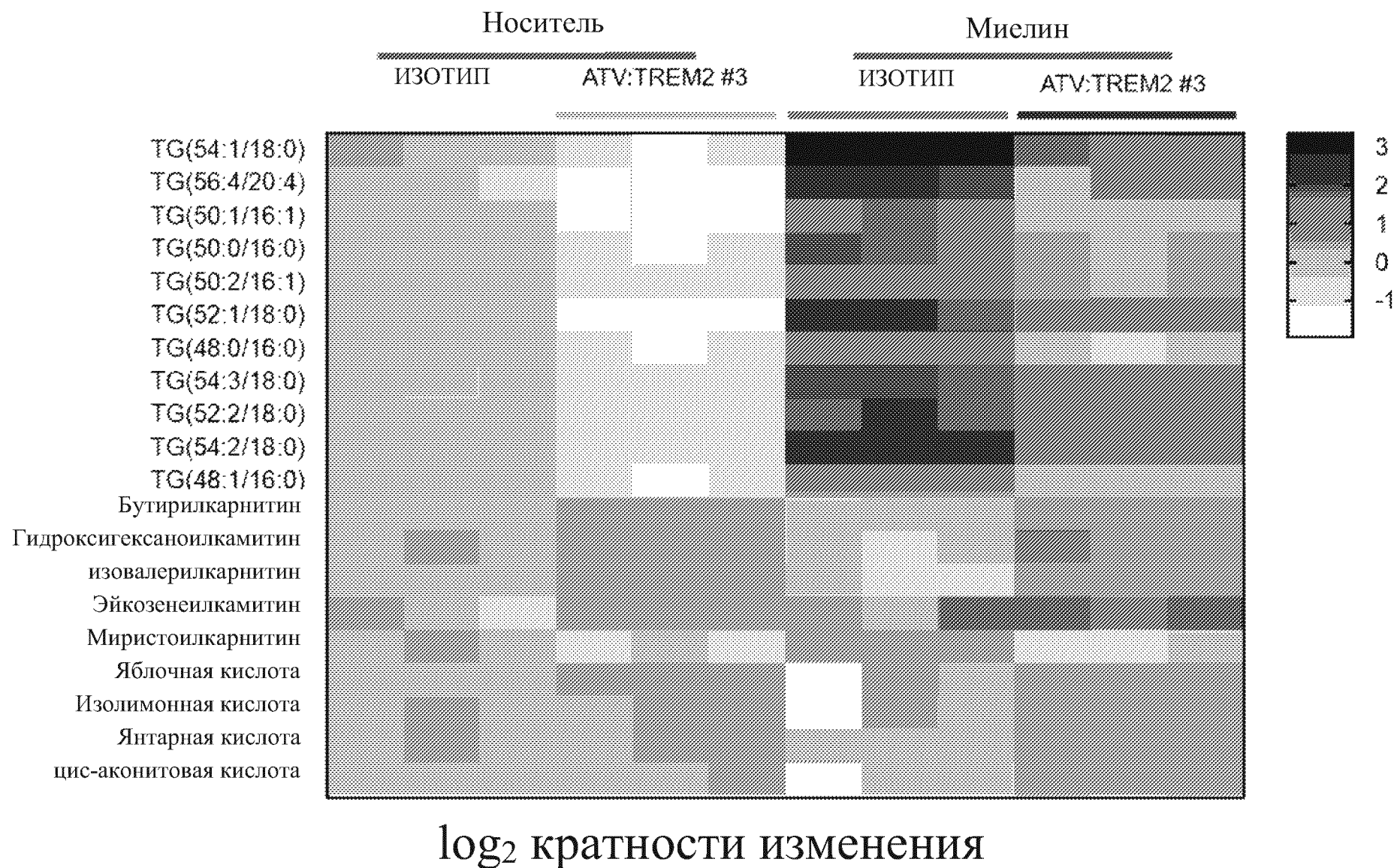
ATV:TREM2 #3



Фиг. 5В



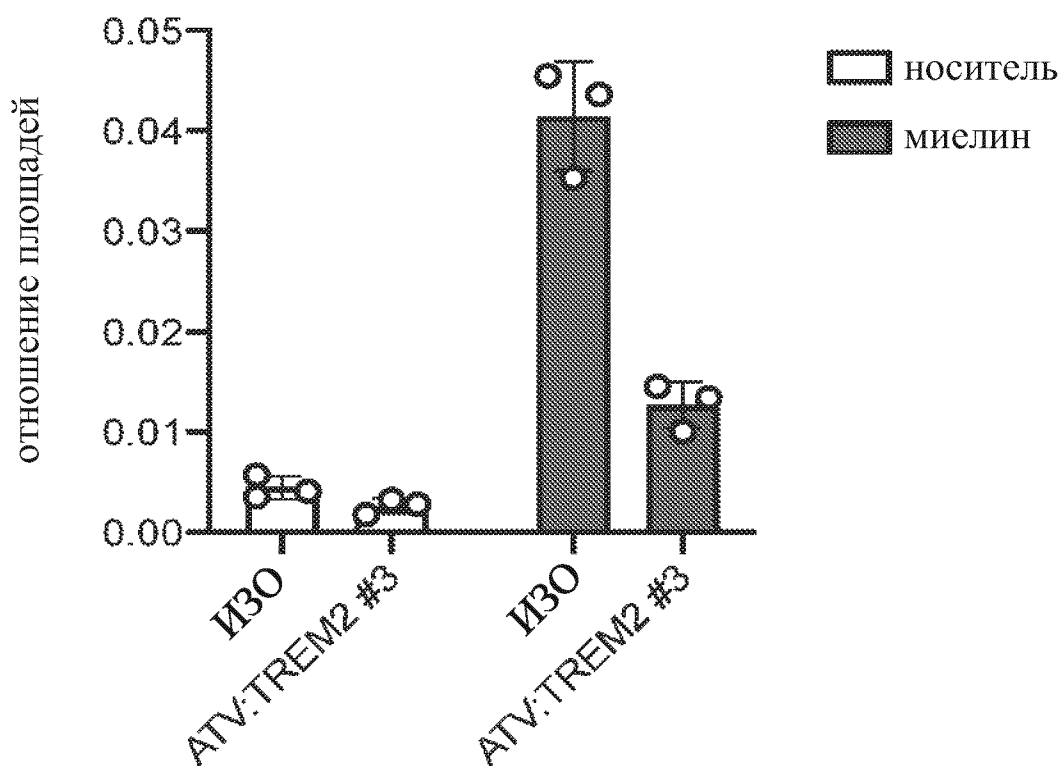
Фиг. 50



Тепловая карта демонстрирует все соединения из > 200 измеренных с кратностью изменения > 1,5 и $p < 0,05$

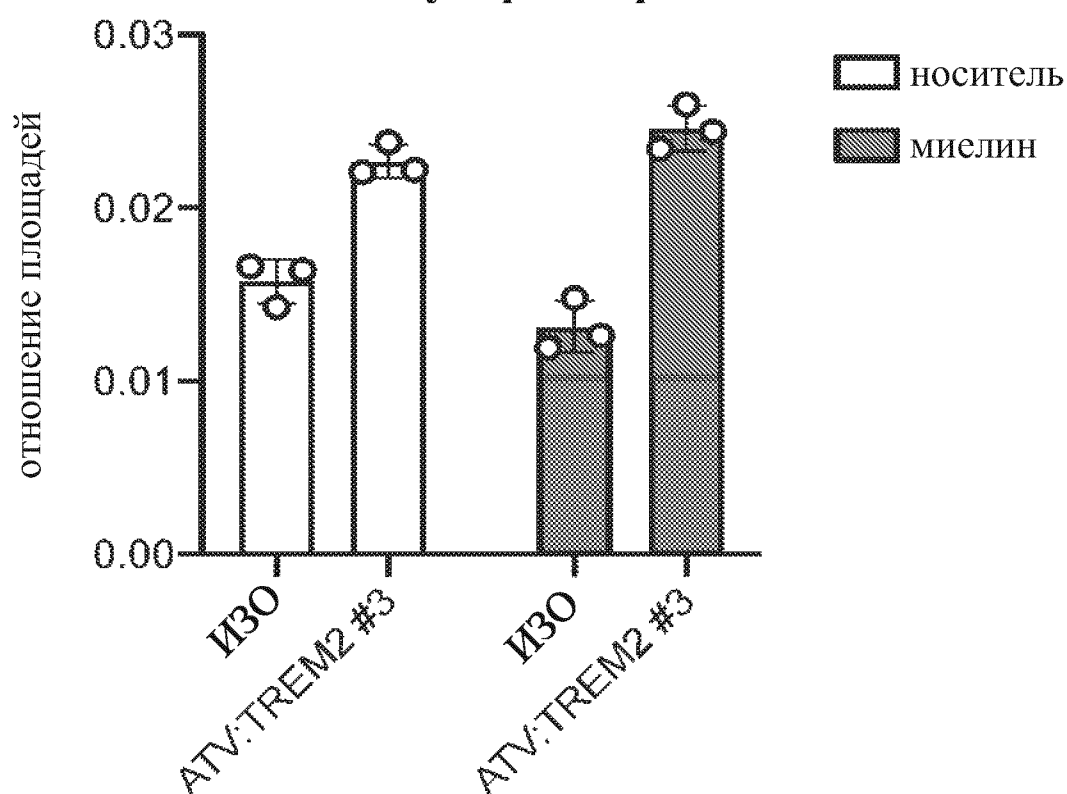
Фиг. 5D

Липид: Триглицерид 54:1/18:0



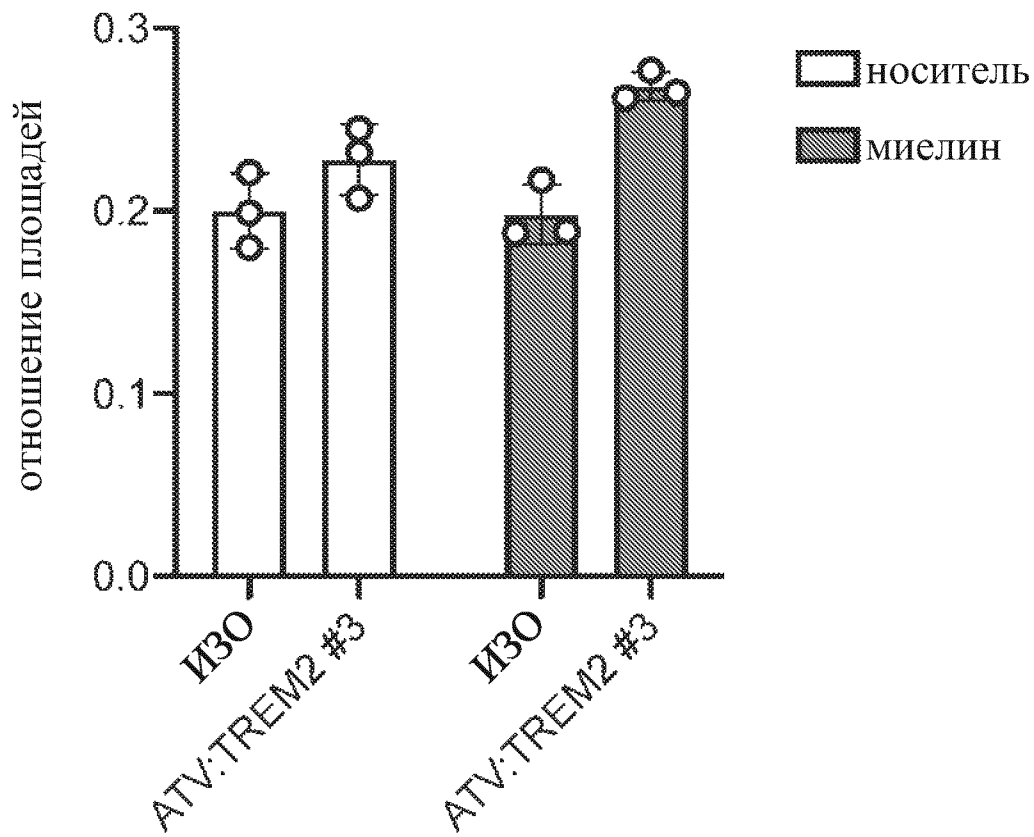
Фиг. 5E

FAO: Бутирилкарнитин



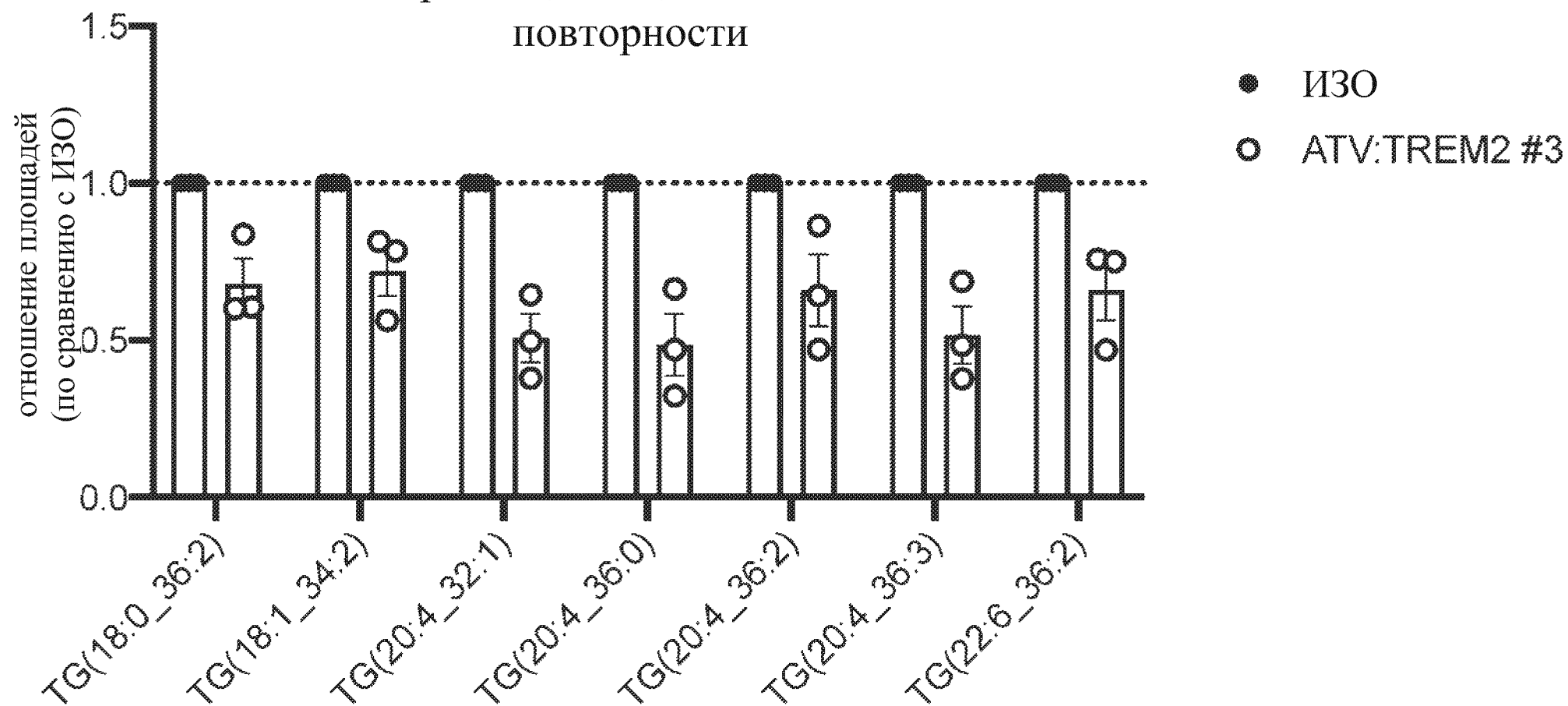
Фиг. 5F

Цикл Кребса: Сукцинат



Фиг. 6А

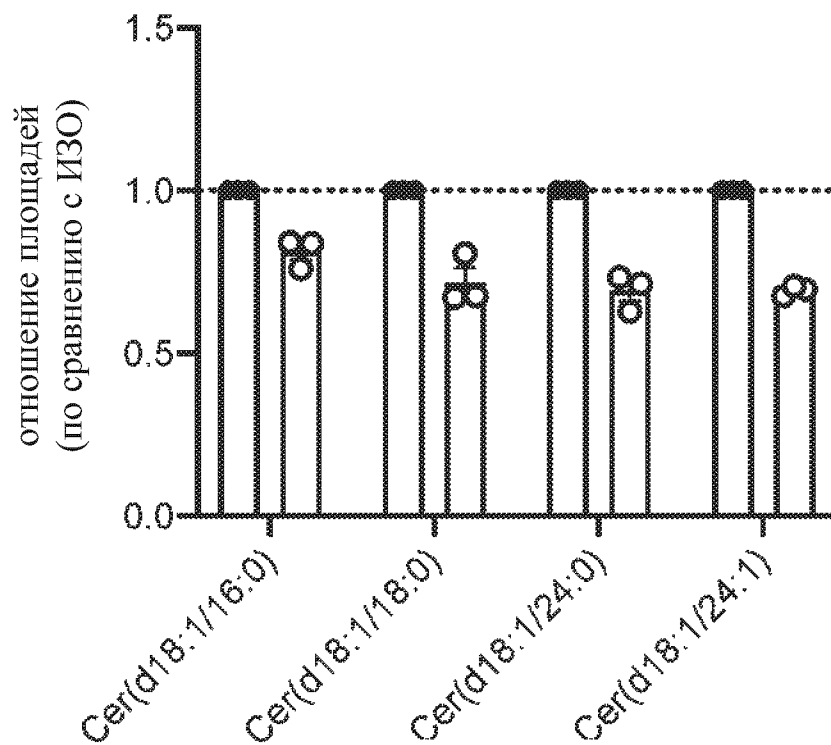
Триглицериды
среднее, СОС, n=3 биол.
повторности



Фиг. 6В

Церамиды

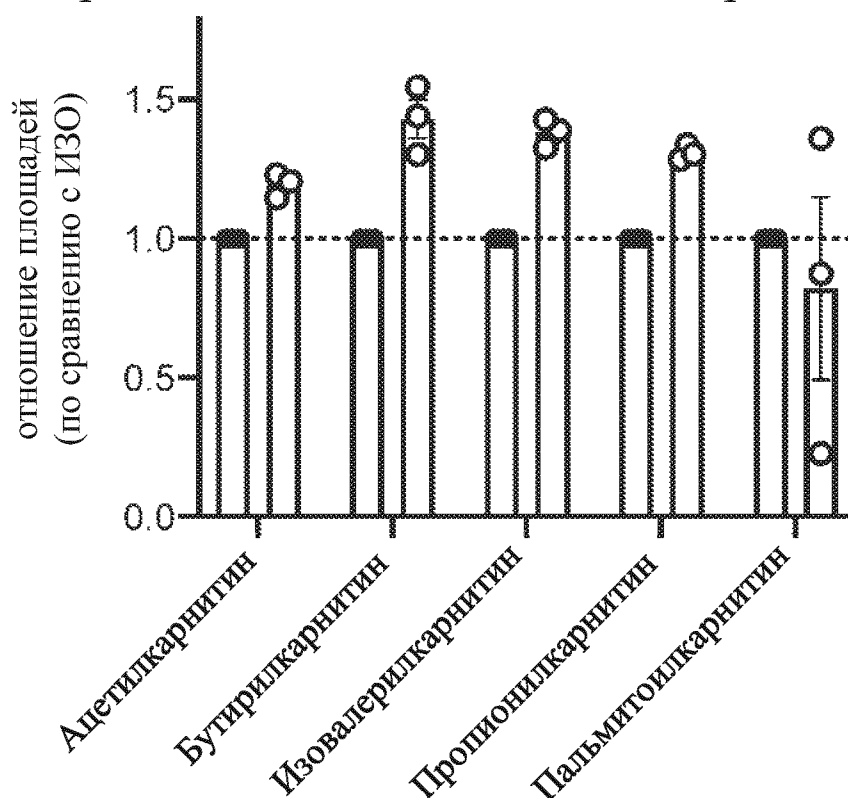
среднее, СОС, n=3 биол. повторности



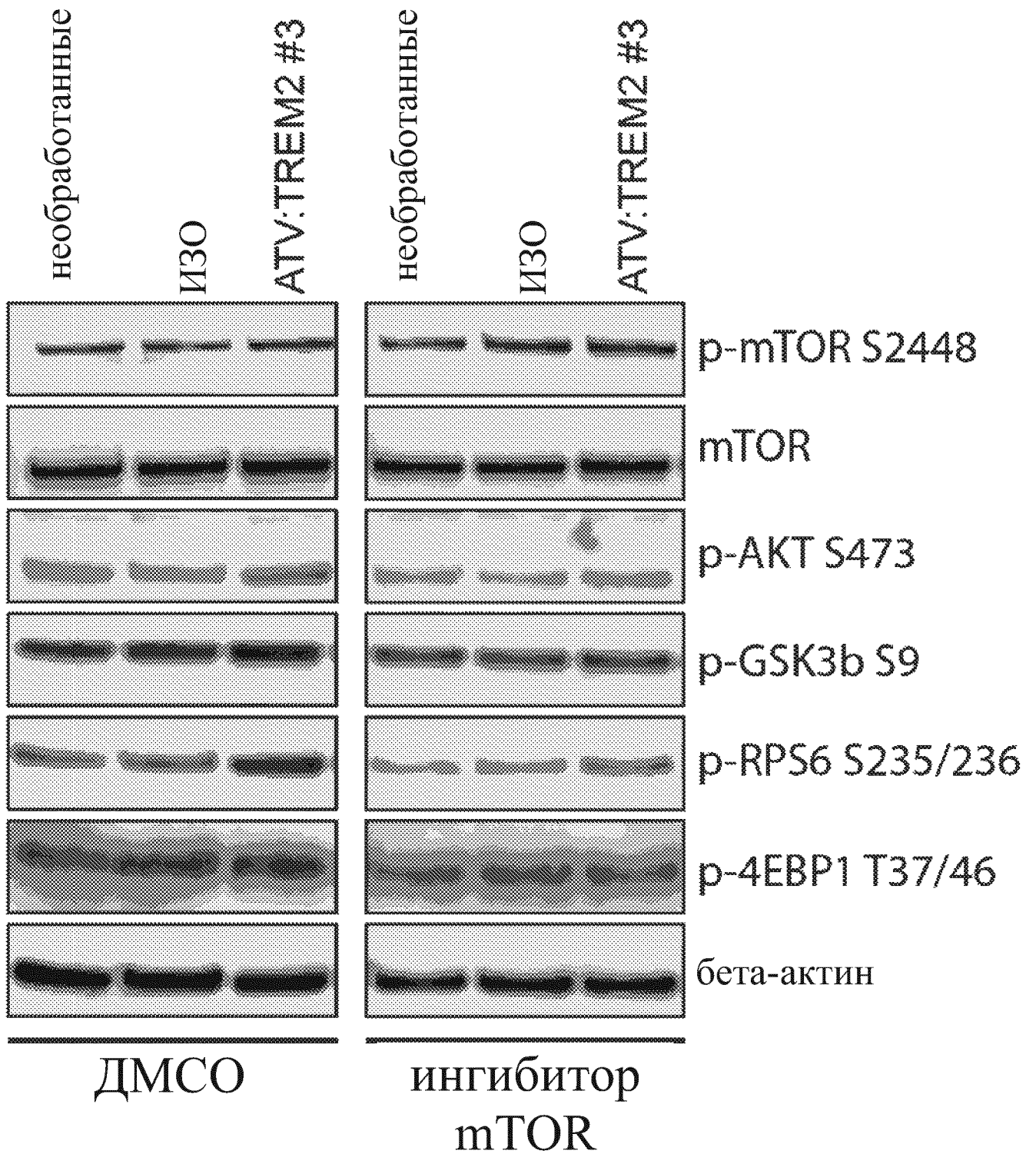
Фиг. 6С

Ацилкарнитины

среднее, СОС, n=3 биол. повторности

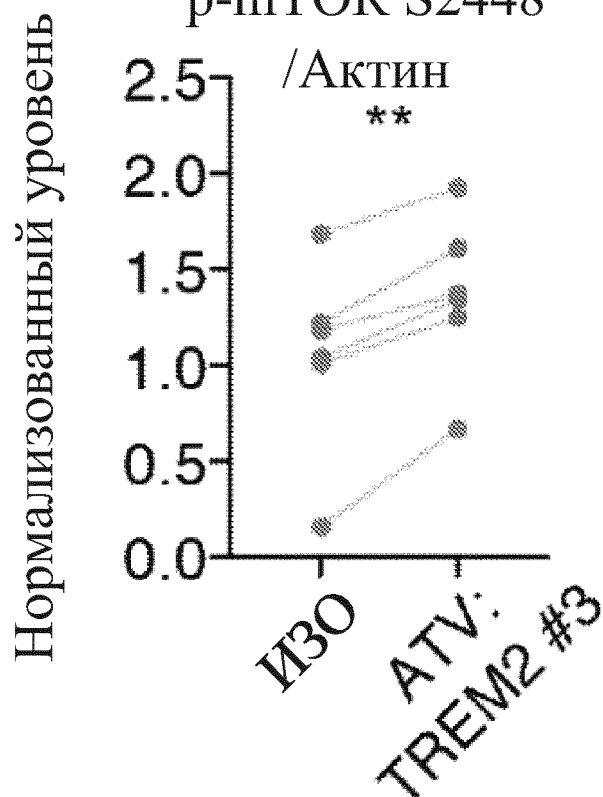


Фиг. 7А



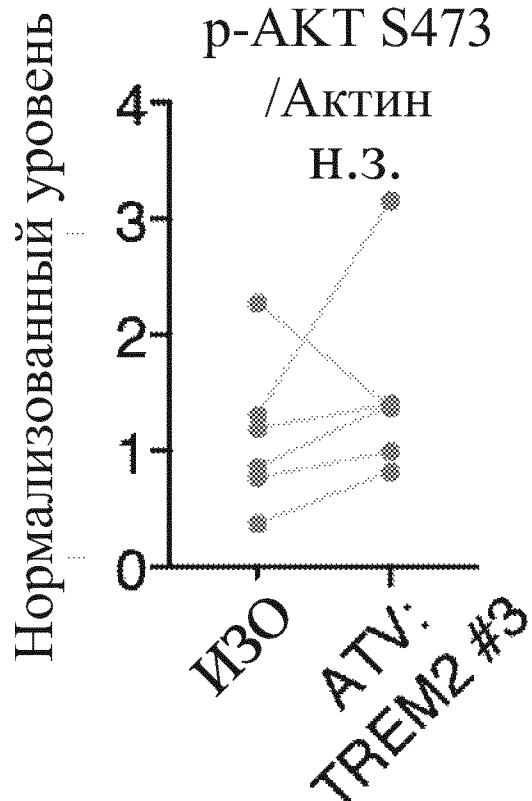
Фиг. 7В

p-mTOR S2448



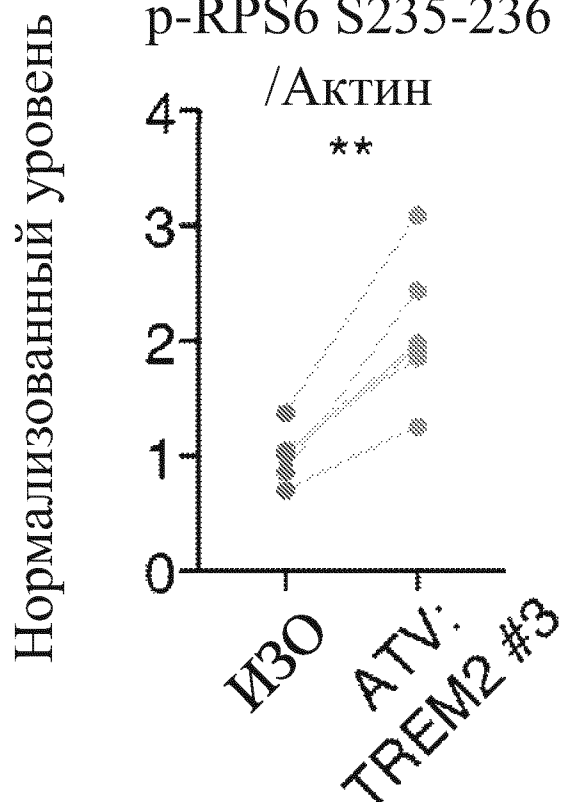
Фиг. 7С

p-AKT S473



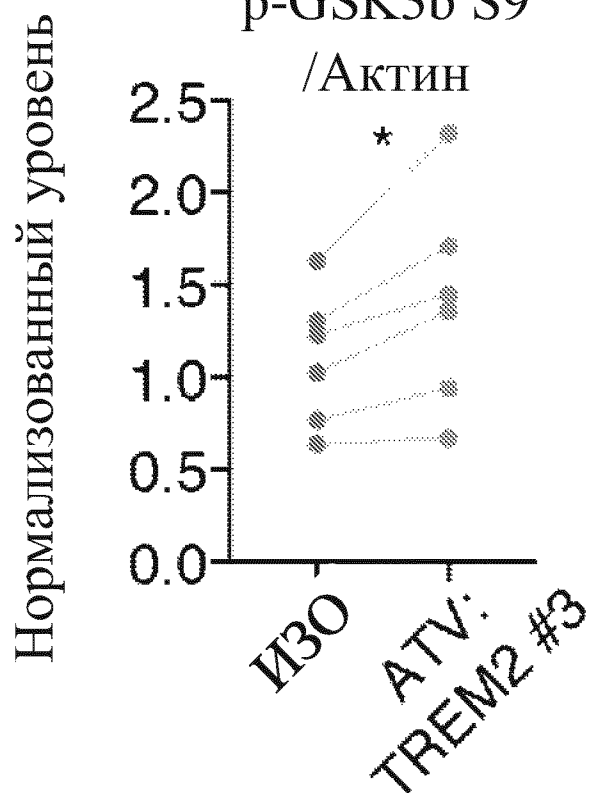
Фиг. 7D

p-RPS6 S235-236



Фиг. 7Е

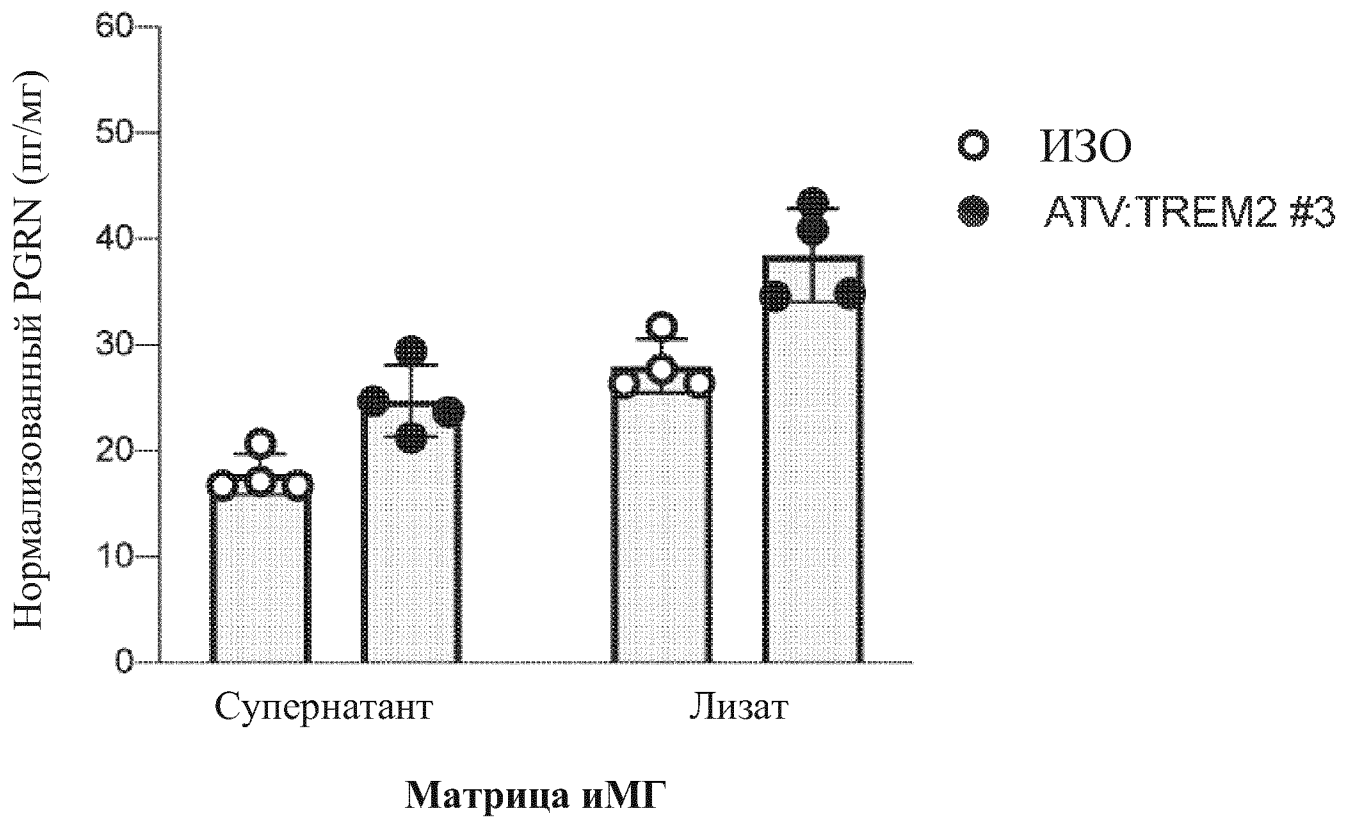
p-GSK3b S9



Фиг. 8

PGRN в иМГ

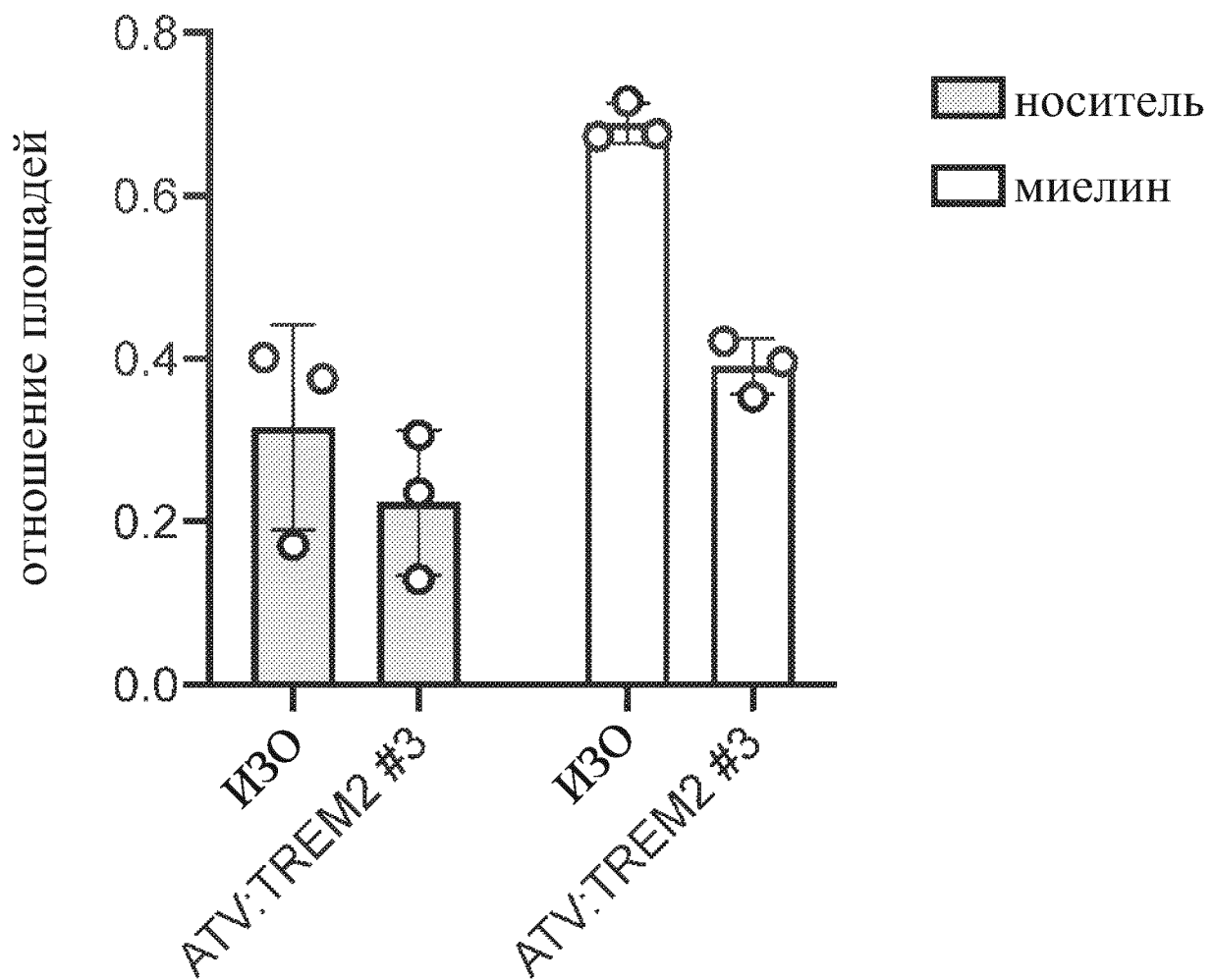
Нормализованный к общему белку



Фиг. 9

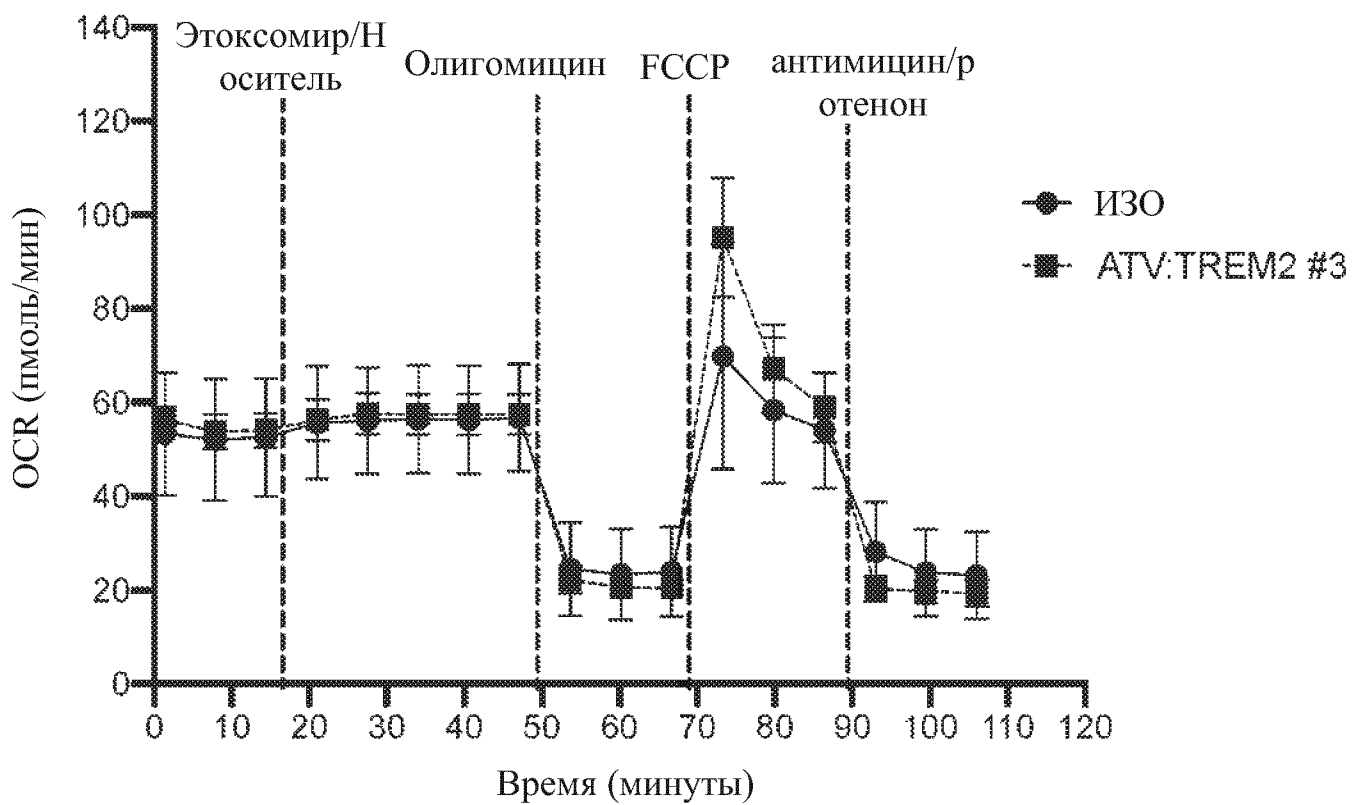
ВМР 18:1/18:1

Образованная из ИПСК микроглия
48ч обработки



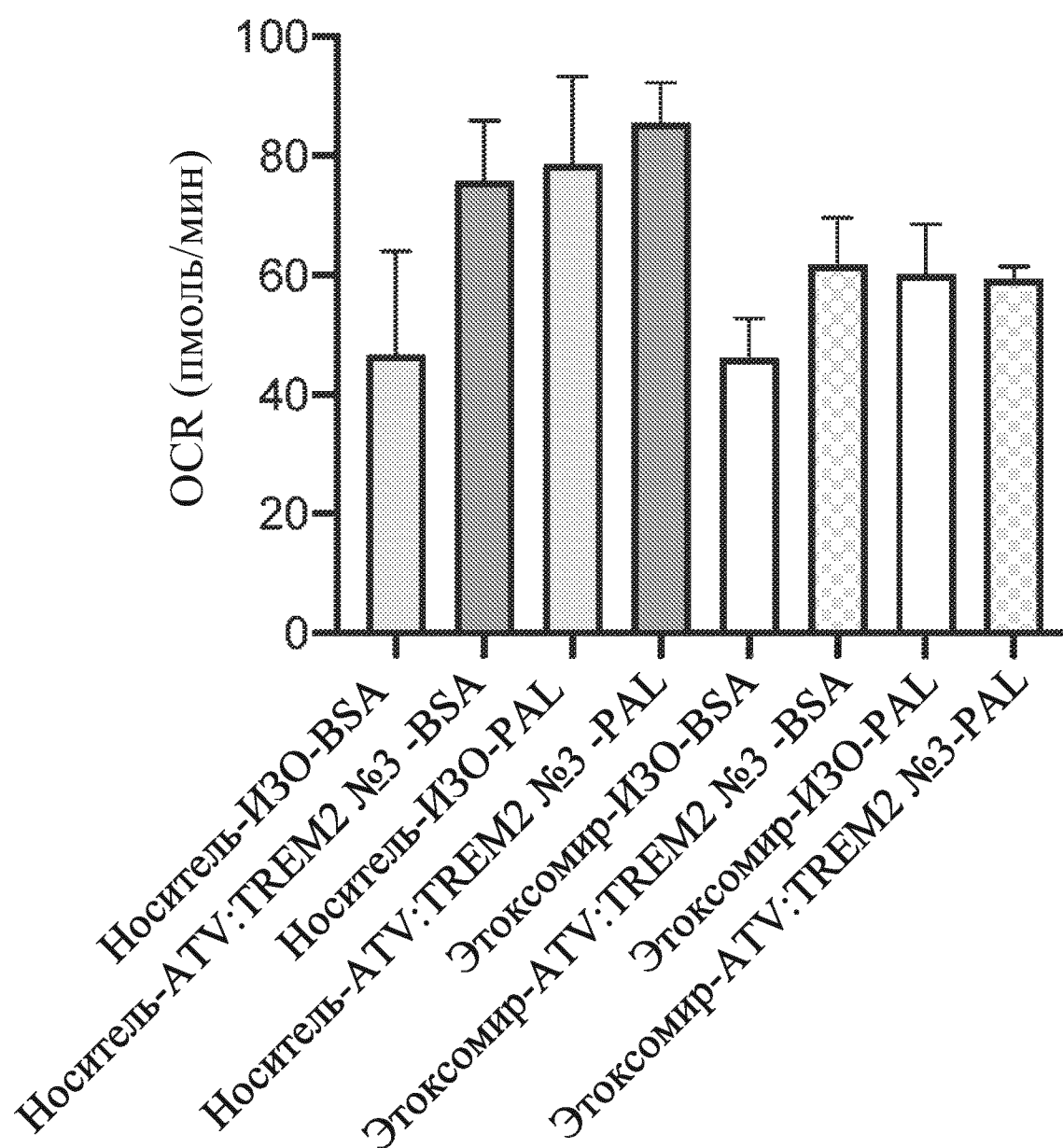
Фиг. 10А

Кинетический график



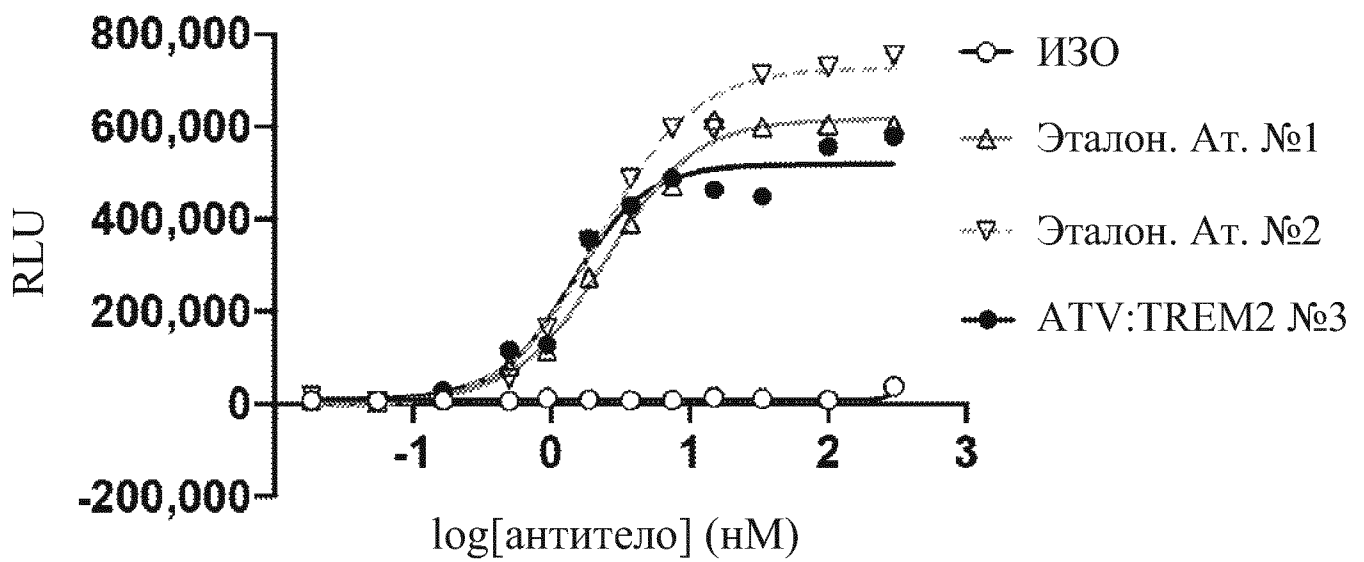
Фиг. 10В

Максимальное дыхание

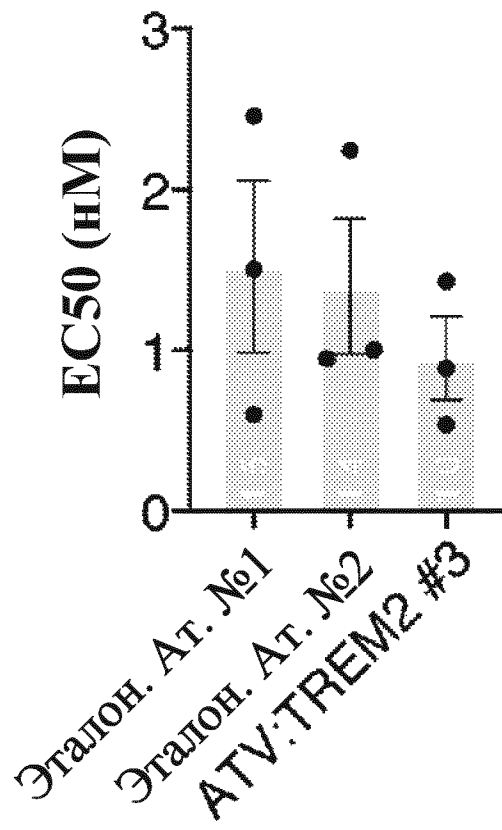


Фиг. 11А

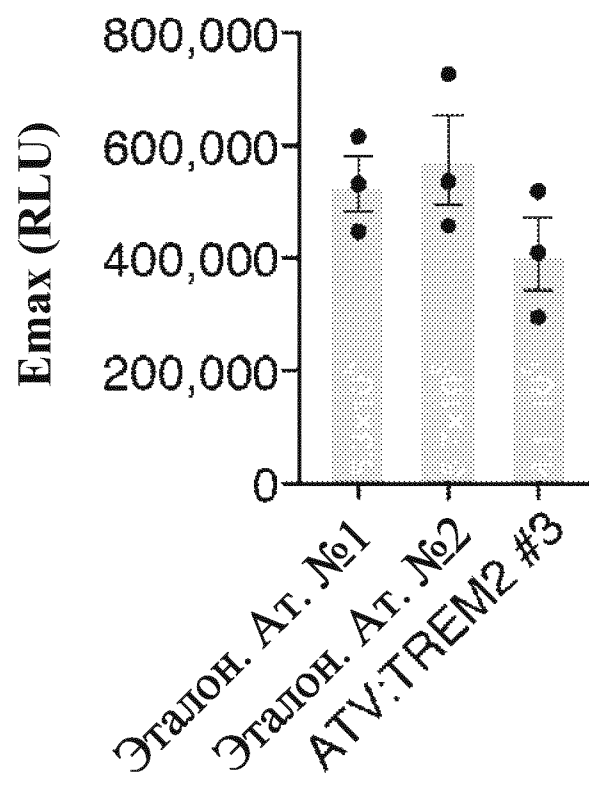
Анализ выживаемости макрофагов человека



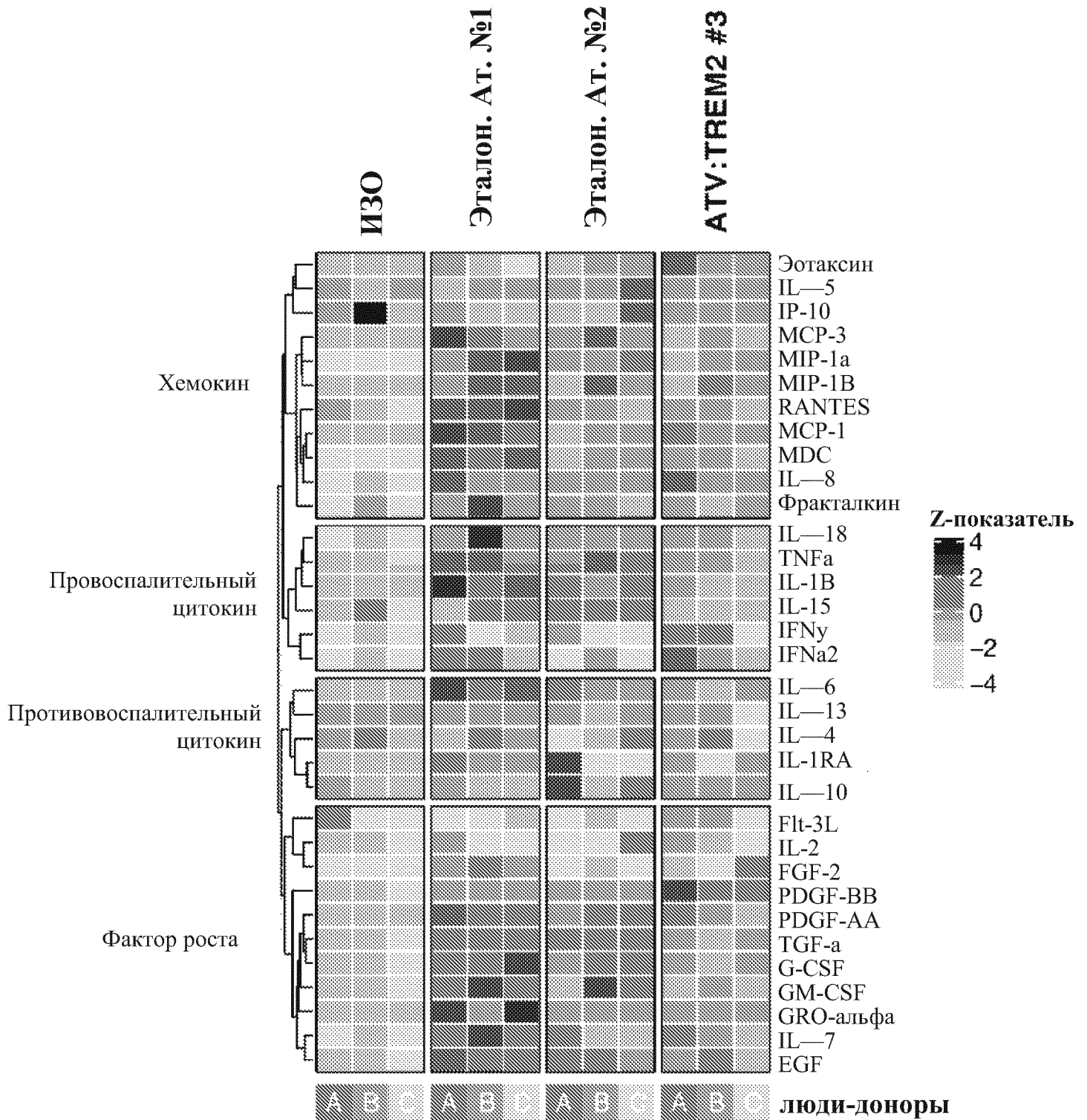
Фиг. 11В



Фиг. 11С



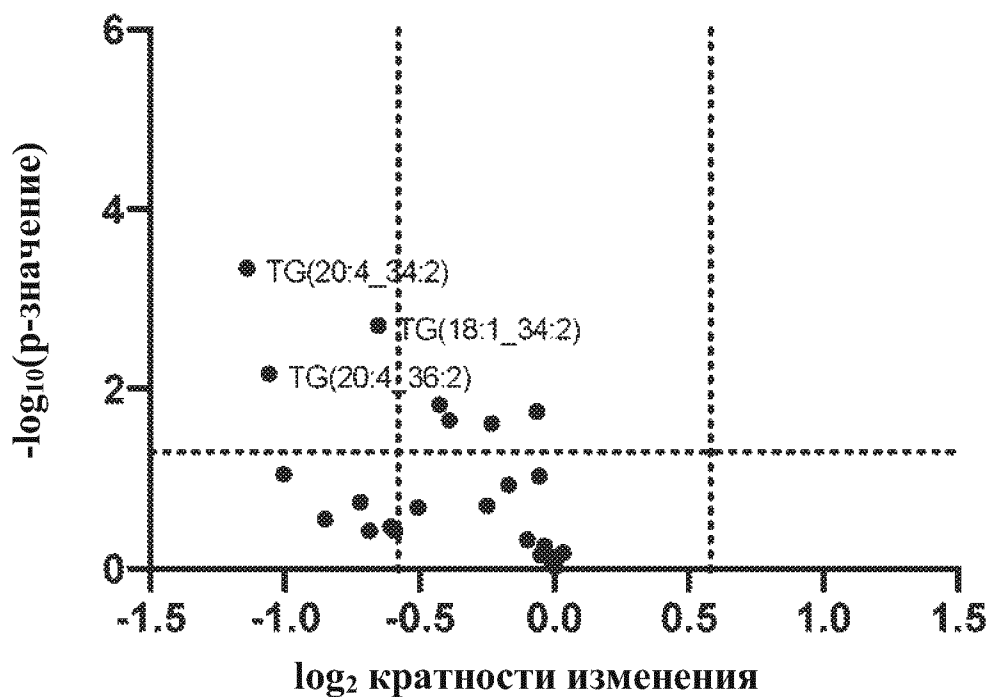
Фиг. 12



Фиг. 13А

ATV:TREM2 №3

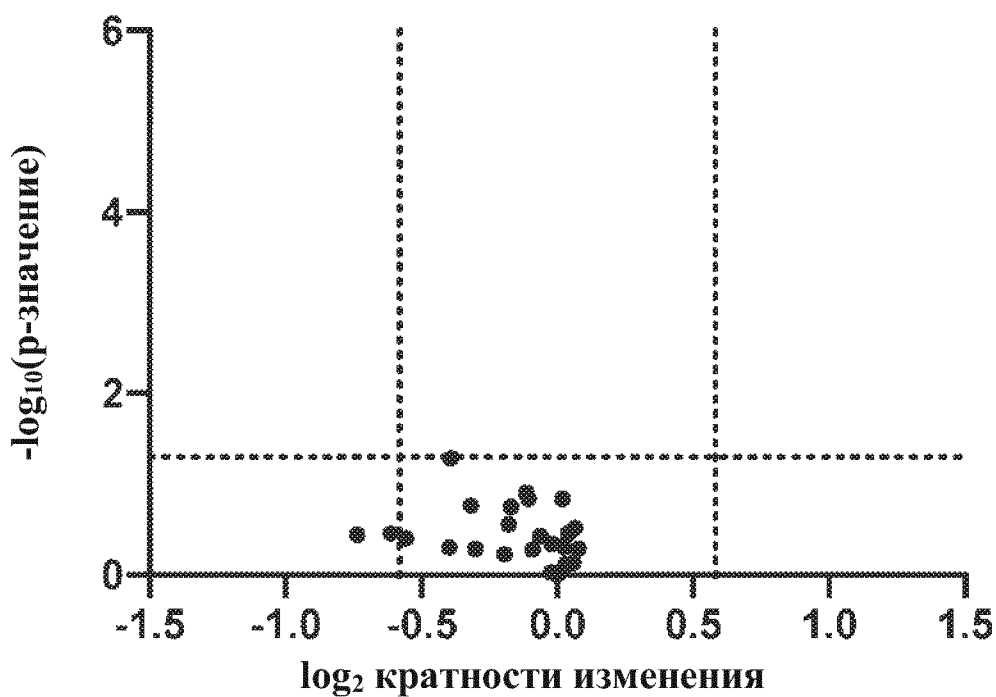
кратность изменения по сравнению с ИЗО



Фиг. 13В

Эталон. Ат. №1

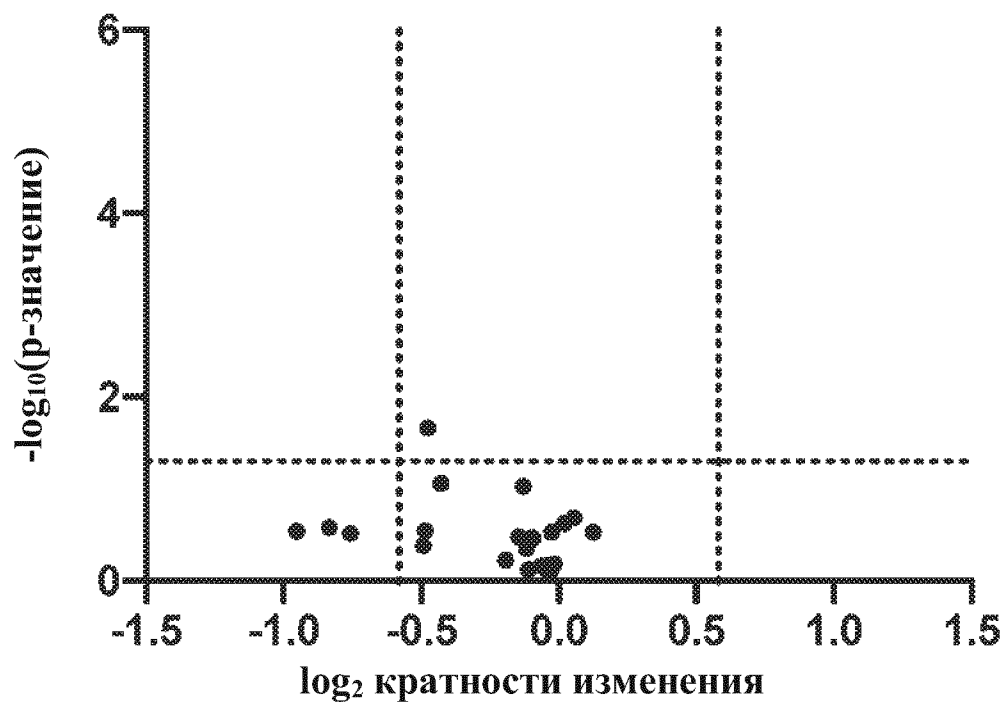
кратность изменения по сравнению с ИЗО



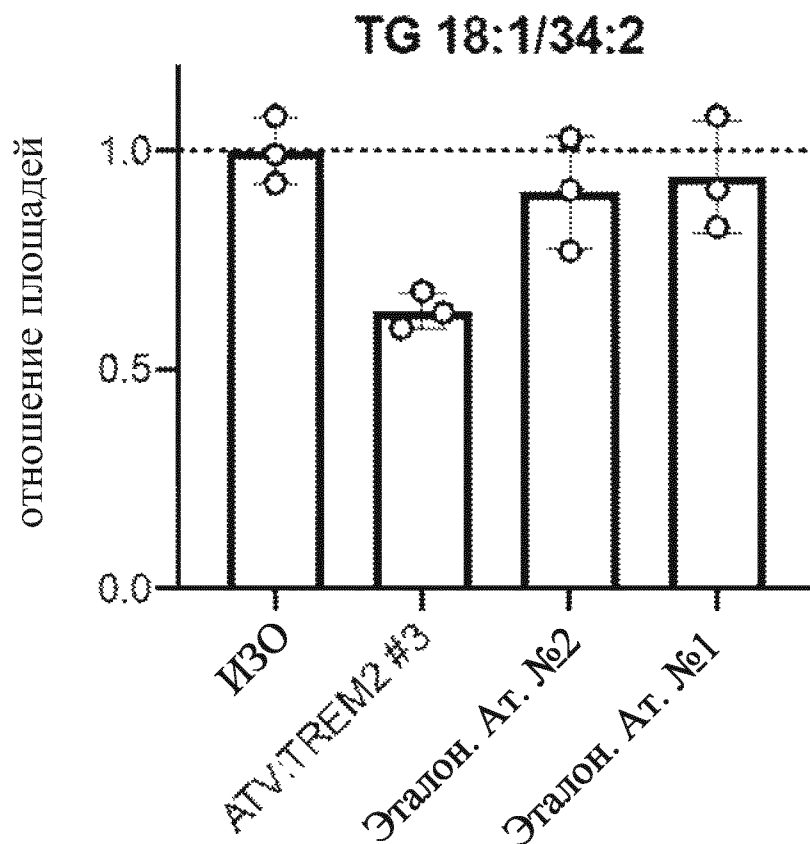
Фиг. 13С

Эталон. Ат. №2

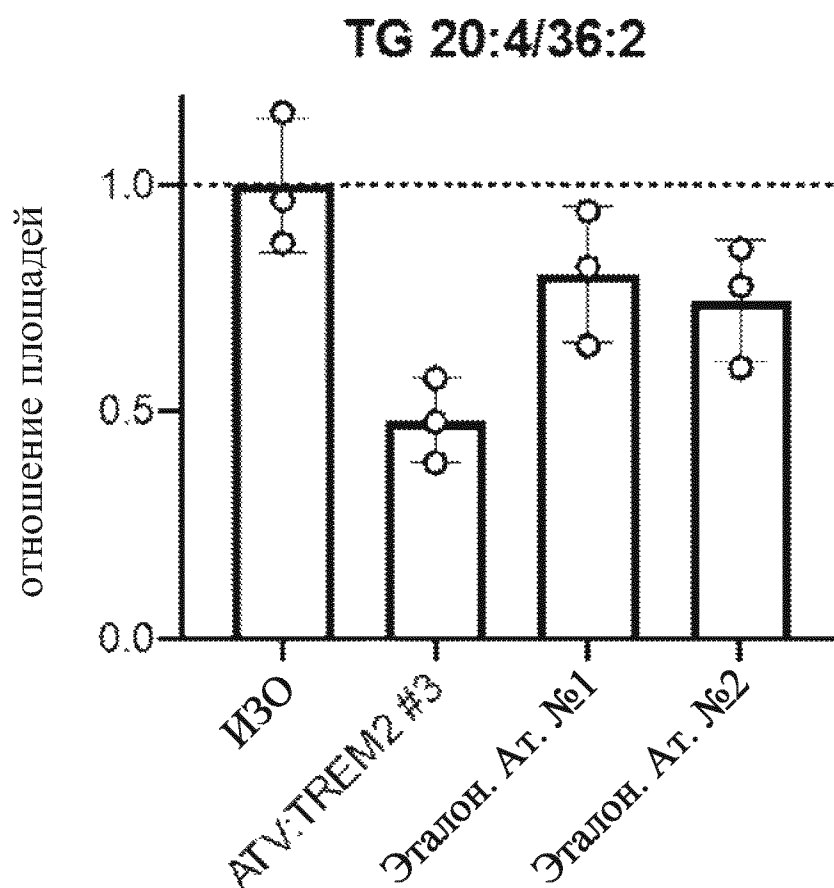
кратность изменения по сравнению с ИЗО



Фиг. 13D

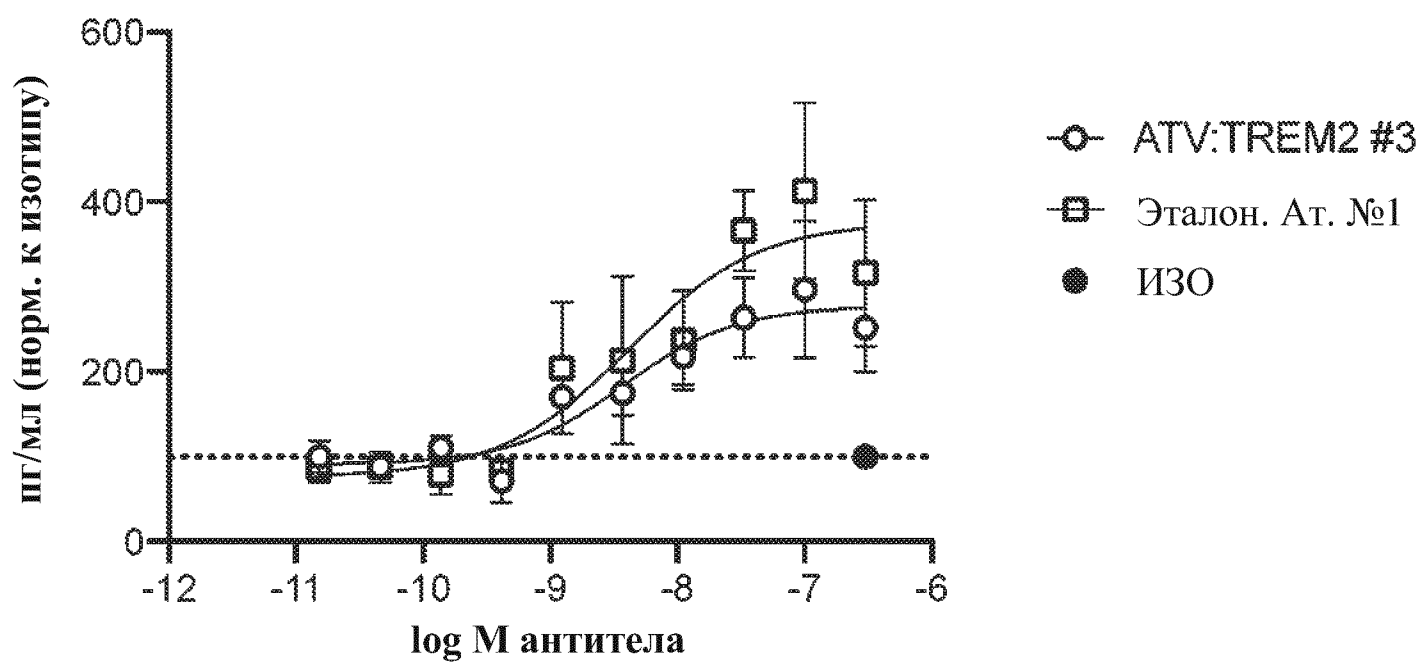


Фиг. 13E



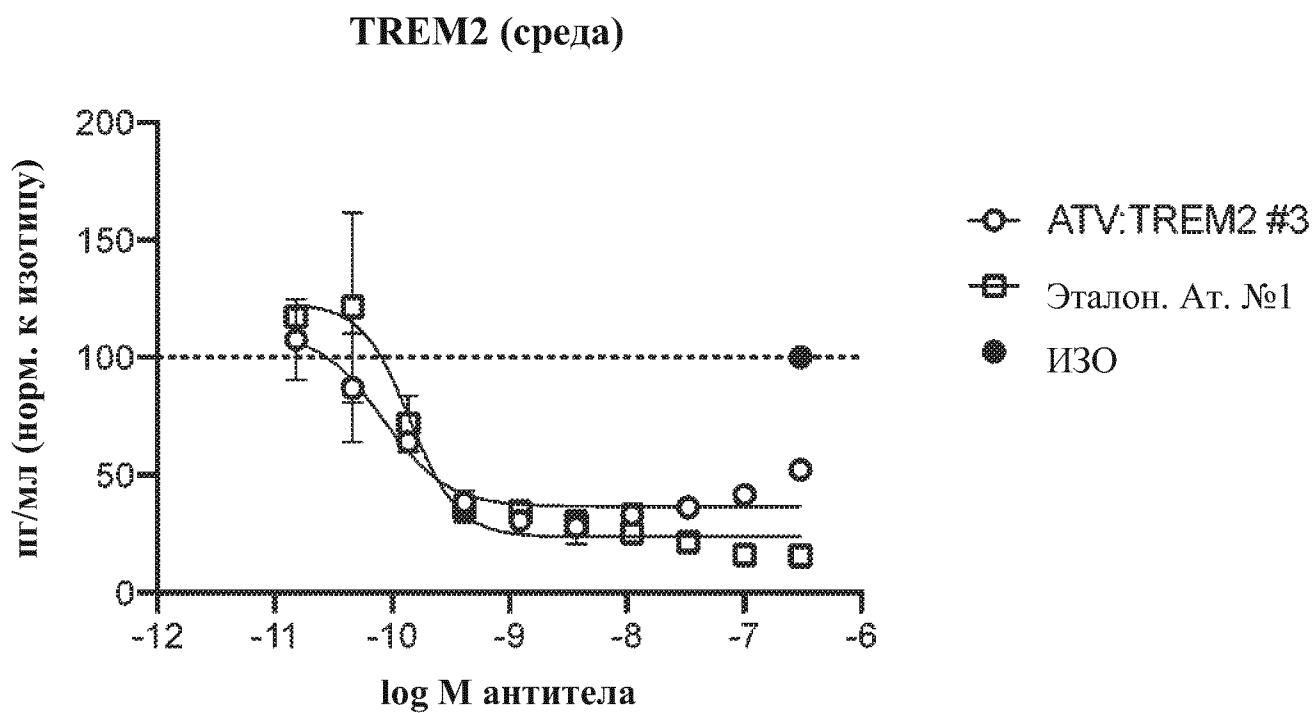
Фиг. 14А

TREM2 (лизат)



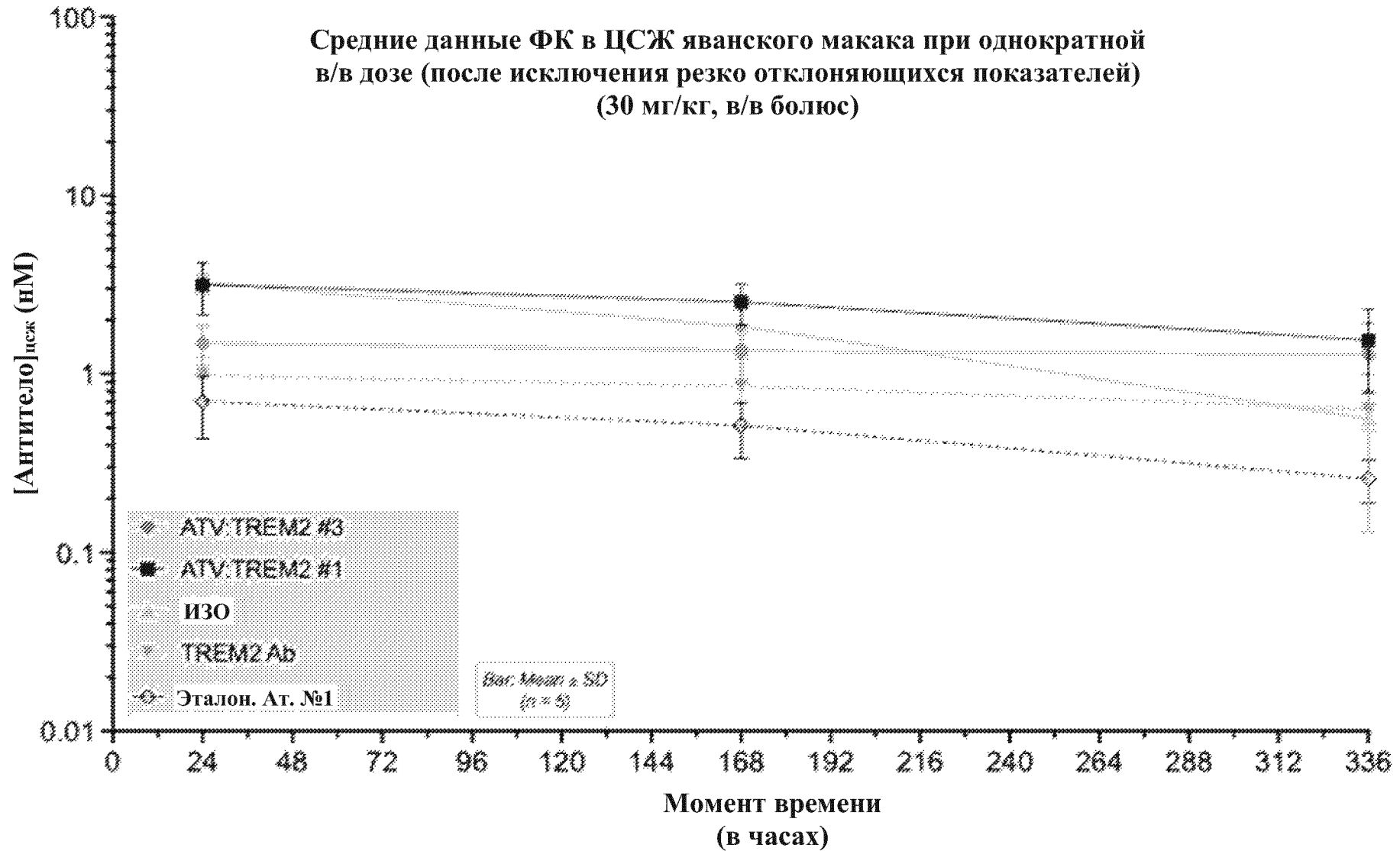
	ATV:TREM2 №3	Эталон. Ат. №1
LogEC50	-8,424	-8,386
угловой коэффициент	0,9910	0,8515
EC50	3,768e-009	4,107e-009

Фиг. 14В

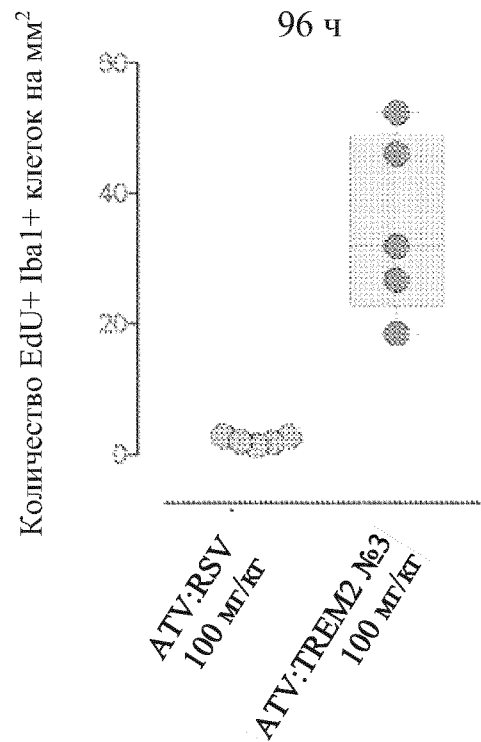


	ATV:TREM2 №3	Эталон. Ат. №1
LogEC50	-10,07	-9,847
угловой коэффициент	-1,602	-2,100
EC50	8,425e-011	1,423e-010

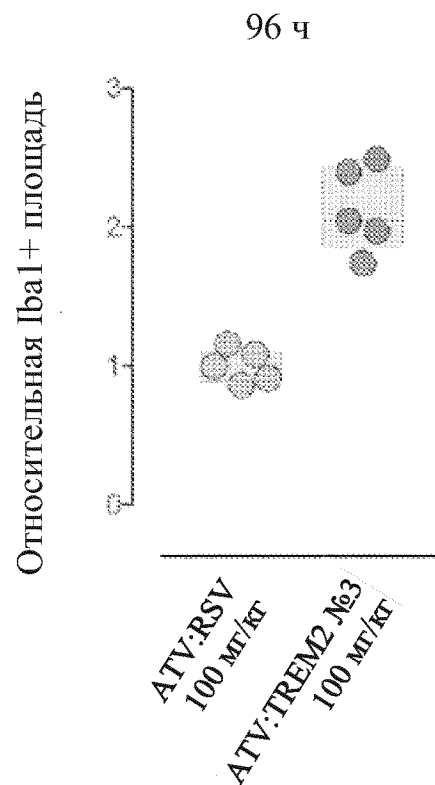
ФИГ. 15



Фиг. 16А

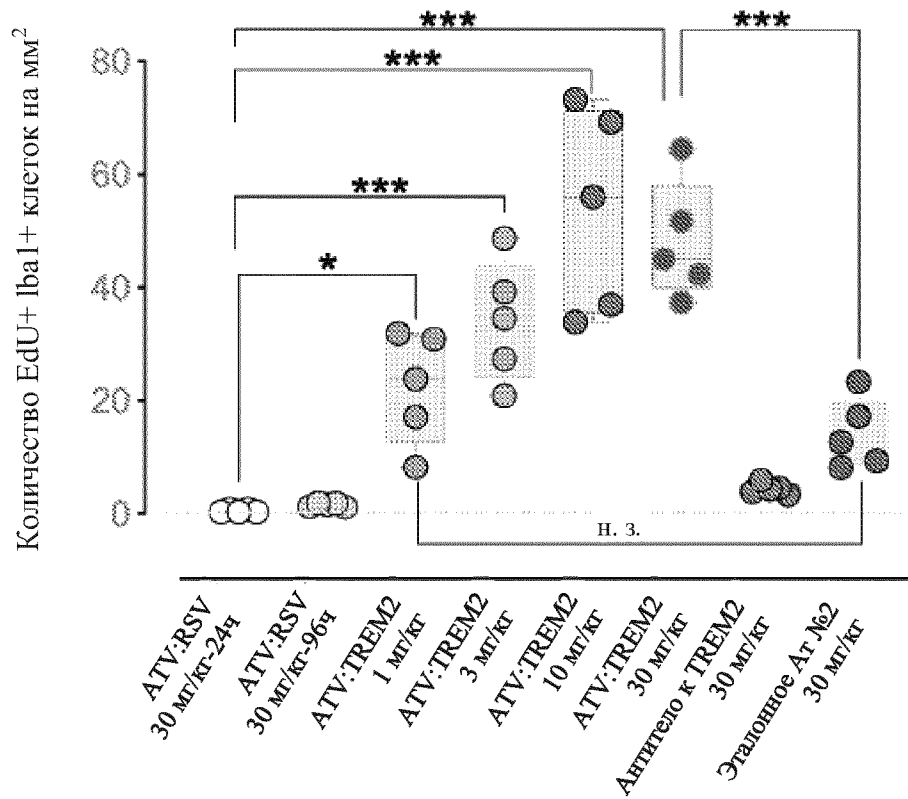


Фиг. 16В



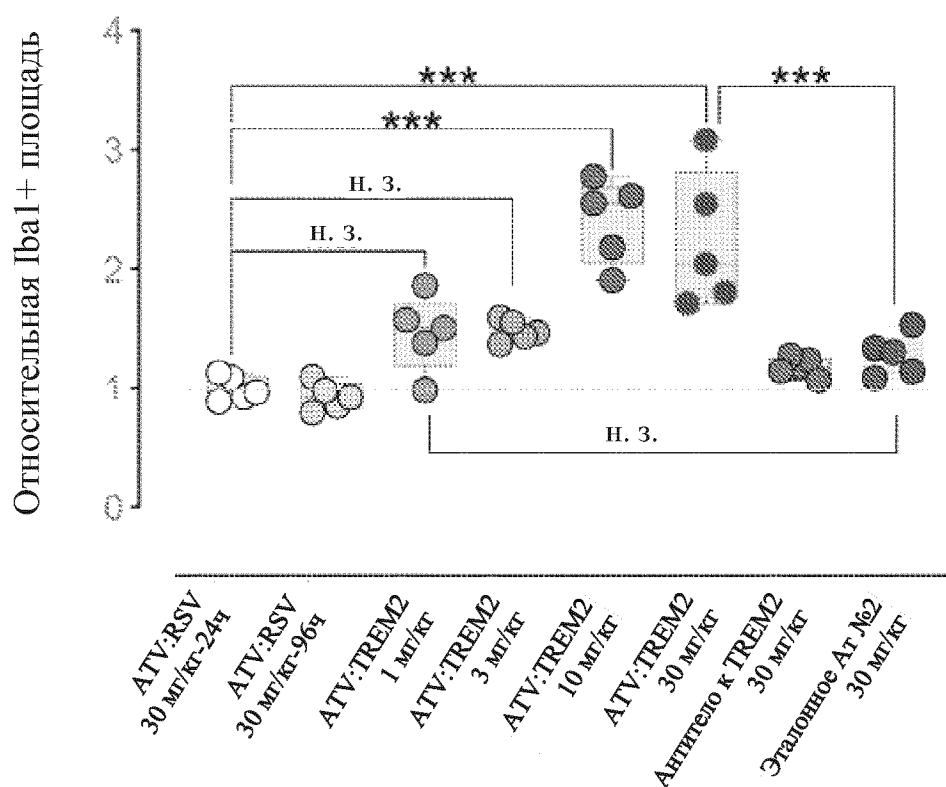
Фиг. 17А

Количество неонатальной микроглии



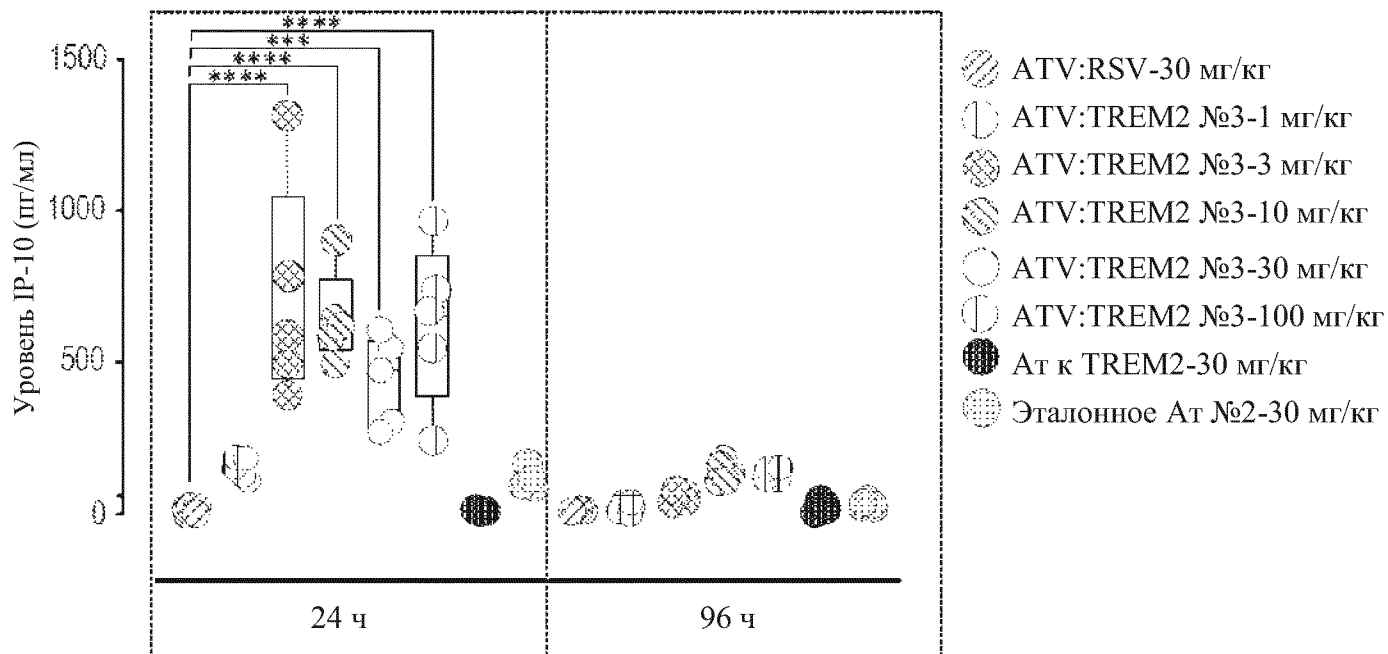
Фиг. 17В

Уровни сигнала Iba1



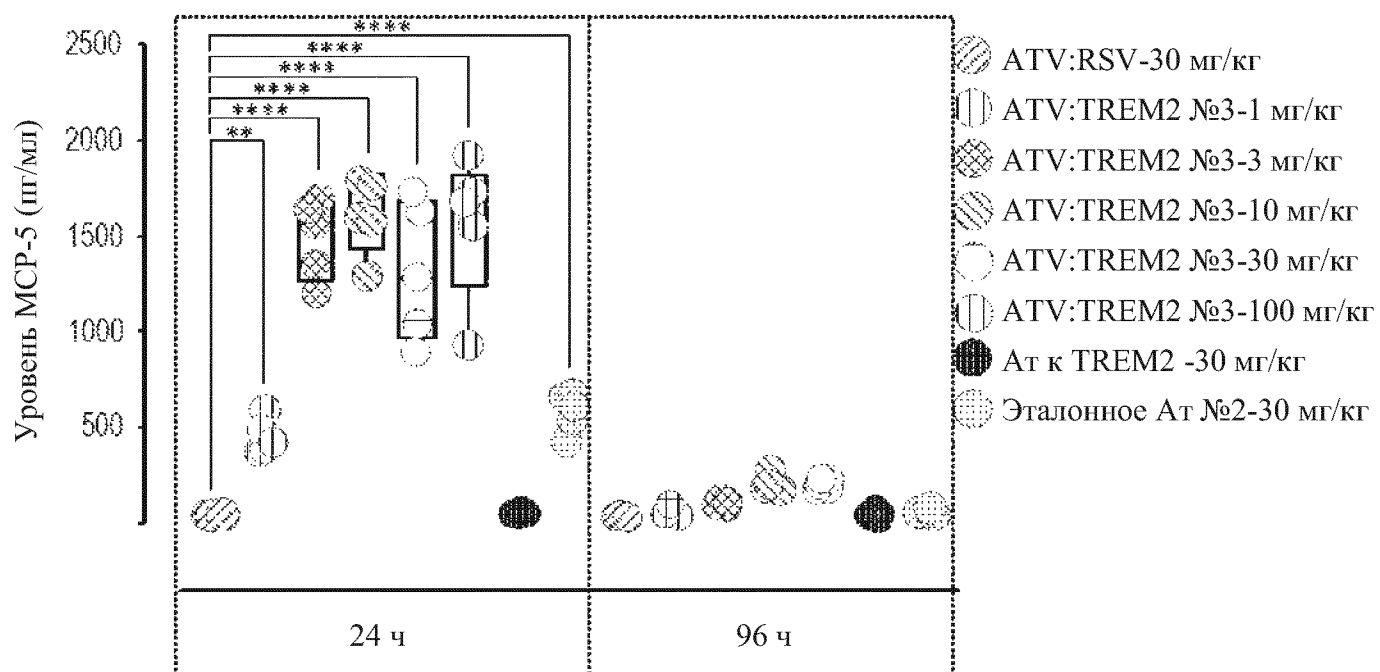
Фиг. 18А

IP-10



Фиг. 18В

MCP-5



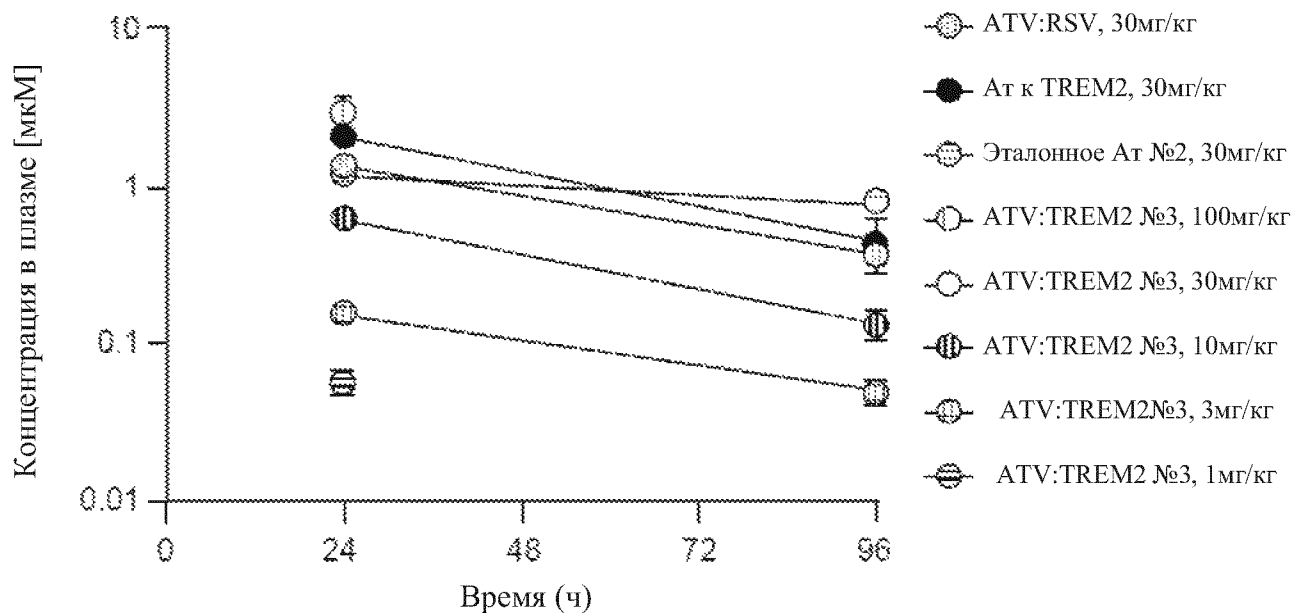
Фиг. 19

Уровни CSF1R в головном мозге



Фиг. 20

Плазма ПК
TB36 x *hTfR-KI*



Фиг. 21

ФК головного мозга
TB36 x *hTfR-KI*

