

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291800 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.29

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

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.04

(54) СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТЕЛ К TREM2

(31) 62/944,298; 63/005,110

(72) Изобретатель:

(32) 2019.12.05; 2020.04.03

Швабе Тина, Тасси Илария,  
Розенталь Арнон, Лун Хуа, Салазар  
Сантьяго Виверос (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/063339

(87) WO 2021/113655 2021.06.10

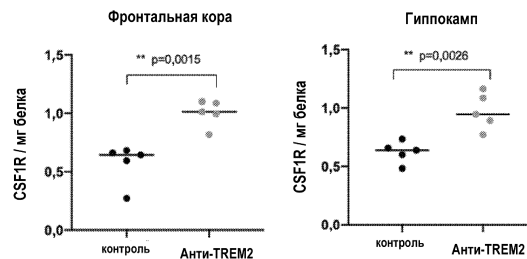
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ЭЛЕКТОР ЭлЭлСи (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение, как правило, направлено на применение антител к TREM2 для профилактики, снижения риска развития или лечения заболевания у индивида, нуждающегося в этом.



A1

202291800

202291800

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574415EA/061

### СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТЕЛ К TREM2

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/944298, поданной 5 декабря 2019 года, и предварительной заявке США № 63/005110, поданной 3 апреля 2020 года, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством во всей своей полноте.

#### ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание следующей подачи в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 735022003240SEQLIST.TXT, дата записи: 2 декабря 2020 г., размер: 88 кб).

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение относится к терапевтическому применению антител к TREM2.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Лейкоэнцефалопатия с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидами и пигментированной глией (ALSP), лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте представляют собой редкие летальные неврологические заболевания, которые изменяют «белое вещество» центральной нервной системы у больных (Freeman et al. (2009) “Adult onset leukodystrophy with neuroaxonal spheroids: Clinical, neuroimaging and neuropathologic observations.” *Brain Pathol.* 19(1): 39-47. PMID: 18422757; Rademakers et al. (2011) “Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids.” *Nat Genet.* 44(2):200-205. PMID: 22197934; Oosterhof et al. (2019) “Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia.” *Am J Hum Genet.* 104(5):936-947. PMID: 30982608). Ранее считалось, что ALSP представляет собой два отдельных состояния: наследственную диффузную лейкоэнцефалопатию (HDLS) и семейную пигментную ортохроматическую лейкоэнцефалопатию (POLD). Однако, учитывая, что пациенты с HDLS и POLD могут иметь пигментированные глиальные клетки и сфероиды, HDLS и POLD считаются частью одного и того же спектра заболеваний, охватываемого ALSP (Nicholson et al. (2013) “CSF1R mutations link POLD and HDLS as a single disease entity.” *Neurology* 80(11): 1033-1040. PMID: 23408870).

[0005] У пациентов с ALSP и лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте характерно набухание аксонов головного мозга, называемое сфероидами. Недавние исследования связали мутации в гене CSF1R с ALSP и лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте (Rademakers et al. (2011); Nicholson et al. (2013); Oosterhof et al. (2019); Guo et al. (2019) “Bi-allelic CSF1R Mutations Cause Skeletal Dysplasia of Dysosteosclerosis-Pyle Disease Spectrum and Degenerative Encephalopathy with Brain Malformation.” *Am J Hum*

Genet. 104(5):925-935. PMID: 30982609).

[0006] Ген CSF1R человека кодирует белок, называемый рецептором колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R). Колониестимулирующий фактор-1 (CSF-1), гомодимерный гликопротеин, является основным лигандом для CSF1R (Sherr et al. (1988) “Colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms).” *J Cell Biochem* 38(3):179-187. PMID: 2852667). CSF1R представляет собой тирозинкиназный рецептор фактора роста III типа, принадлежащий к семейству рецепторов PDGF. Члены семейства рецепторов имеют белковые структуры, состоящие из иммуноглобулиноподобных доменов, трансмембранного домена и протеинкиназного домена. В частности, CSF1R состоит из высокогликозилированного внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного домена протеинтирозинкиназы. CSF1R обнаружен во внешней мембране различных типов клеток, включая макрофаги, и служит рецептором фактора роста для колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1) (Pridans et al. (2013) “CSF1R mutations in hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids are loss of function”. *Sci Rep* 3: 3012. PMID: 24145216; Ridge et al. (1990) “FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects.” *87(4): 1377-1380*. PMID: 2406720; Oosterhof et al; Rademaker et al). Было показано, что сигналинг через CSF1R регулирует пролиферацию и развитие макрофагов, включая микроглиальные клетки. В частности, сигналинг CSF1R может отвечать за образование большинства зрелых макрофагов, включая микроглию головного мозга. Дефицит CSF1R негативно влияет на развитие микроглии в головном мозге (Swerdlow et al. (2009) “Autosomal dominant subcortical gliosis presenting as frontotemporal dementia.” *Neurology* 72(3):260-267. PMID: 19153373; Baba et al. (2006) “Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids: clinical, pathologic and genetic studies of a new kindred.” *Acta Neuropathol.* 111(4):300-311. PMID: 16523341; Oosterhof et al.; Rademaker et al.; Guo et al., 2019).

[0007] В настоящее время не существует эффективных вариантов лечения пациентов, страдающих ALSP, лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте и родственными заболеваниями. Имеющиеся методы лечения устраняют симптомы заболевания, а не лечат его. Таким образом, в данной области техники существует потребность в новых методах лечения для обеспечения терапевтических вариантов и улучшения результатов для пациентов, страдающих ALSP, лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте и родственными заболеваниями.

[0008] Все ссылки, приведенные в данном документе, включая заявки на патенты и публикации, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Настоящее изобретение, как правило, относится к способам лечения индивида с обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием, включающим введение индивиду антитела, которое связывается с белком TREM2, где антитело представляет собой агонист.

[0010] Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны, по крайней мере

частично, на открытии того, что агонистическое антитело к TREM2 значительно повышает жизнеспособность макрофагов человека, выращенных в присутствии ингибитора CSF1R, по сравнению с макрофагами человека, выращенными в присутствии ингибитора CSF1R и контрольный IgG (см., например, Пример 2).

[0011] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики обусловленного дефицитом CSF1R заболевания, включающему введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с белком TREM2, где антитело является агонистом и при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает одну или более активностей TREM2, индуцированных связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает одну или более активностей TREM2, не блокируя связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из следующего: клетки E. coli, апоптотические клетки, нуклеиновые кислоты, анионные липиды, анионные липиды, APOE, APOE2, APOE3, APOE4, анионный APOE, анионный APOE2, анионный APOE3, анионный APOE4, липидированный APOE, липидированный APOE2, липидированный APOE3, липидированный APOE4, цвиттерионные липиды, отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилсерин, сульфатиды, фосфатидилхолин, сфингомиелин, мембранные фосфолипиды, липидированные белки, протеолипиды, липидированные пептиды, липидированный бета-амилоидный пептид и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает одну или более активностей TREM2 в отсутствие кластеризации TREM2 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает одну или более активностей TREM2 путем индукции или сохранения кластеризации TREM2 на клеточной поверхности.

[0013] В некоторых вариантах осуществления белок TREM2 представляет собой белок млекопитающего или белок человека. В некоторых вариантах осуществления белок TREM2 представляет собой белок дикого типа, встречающийся в природе вариант или связанный с заболеванием вариант.

[0014] В некоторых вариантах осуществления одна или более активностей TREM2, которые индуцируются или усиливаются антителом, выбрано из группы, состоящей из следующего: (a) связывание TREM2 с DAP12; (b) фосфорилирование DAP12; (c) активация киназы Syk; (d) модуляция одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CRP, MCP-1/CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CXCL-10, Gata3, членов семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, CSF-1, OPN, CD11c, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, и IL-23, необязательно при этом модуляция происходит в одной или более клетках,

выбранных из группы, состоящей из макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и микроглиальных клеток; (e) рекрутирование Syk в комплекс DAP12/TREM2; (f) повышение активности одного или более TREM2-зависимых генов, необязательно при этом один или более TREM2-зависимых генов содержат факторы транскрипции ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT); (g) повышение выживаемости дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера, микроглии, микроглии M1, активированной микроглии M1 и микроглии M2 или любой их комбинации; (h) модулированная экспрессия одной или более стимулирующих молекул, выбранных из группы, состоящей из CD83, CD86 MHC класса II, CD40 и любой их комбинации, необязательно при этом CD40 экспрессируется на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах или любой их комбинации, и необязательно при этом дендритные клетки включают дендритные клетки костного мозга; (i) улучшение памяти; и (j) уменьшение когнитивного дефицита.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело способствует выживаемости макрофагов, культивируемых в отсутствие CSF1. В некоторых вариантах осуществления антитело снижает уровни растворимого TREM2 в плазме *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует расщепление TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует экспрессию CSF1R или повышает уровни CSF1R у индивида по сравнению с индивидом, не получавшим лечения, или индивидом, получавшим контрольное антитело. В некоторых вариантах осуществления индукция экспрессии CSF1R или повышение уровня CSF1R происходит в головном мозге индивида. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию измерения уровня CSF1R в образце, взятом у индивида.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мышинное антитело, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, поливалентное антитело, конъюгированное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 124-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 124-153. SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 129-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 129-153 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 140-149 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-149 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 149-157 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 149-157 SEQ ID NO: 1; или в пределах аминокислотных остатков 153-162 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным

остаткам 153-162 SEQ ID NO: 1.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1, или одним или более аминокислотными остатками на белке TREM2 млекопитающих, соответствующих аминокислотному остатку, выбранному из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем HVR-H1 включает аминокислотную последовательность YAFSSQWMN (SEQ ID NO: 34), HVR-H2 включает аминокислотную последовательность RIYPGGDTNYAGKFQG (SEQ ID NO: 35), HVR-H3 включает аминокислотную последовательность ARLLRNQPGESYAMDY (SEQ ID NO: 31), HVR-L1 включает аминокислотную последовательность RSSQLVHSNRYTYLH (SEQ ID NO: 41), HVR-L2 включает аминокислотную последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO: 33), а HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SQSTRVPYT (SEQ ID NO: 32).

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем HVR-H1 включает аминокислотную последовательность YAFSSDWMN (SEQ ID NO: 36), HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность RIYPGEGDTNYARKFHG (SEQ ID NO: 37), HVR-H3 включает аминокислотную последовательность ARLLRNKPGESYAMDY (SEQ ID NO: 38), HVR-L1 включает аминокислотную последовательность RTSQLVHSNAYTYLH (SEQ ID NO: 39), HVR-L2 включает аминокислотную последовательность KVSNRVS (SEQ ID NO: 40), а HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SQSTRVPYT (SEQ ID NO: 32).

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент, а фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело

имеет изотип IgG1 человека и содержит аминокислотные замены в области Fc в положениях остатков P331S и E430G, где нумерация остатков соответствует нумерации EU.

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; или (b) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или (b) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

[0026] В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой лейкоэнцефалопатию с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP). В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой лейкоэнцефалопатию с дебютом в детском возрасте.

[0027] В некоторых вариантах осуществления индивид имеет мутацию в гене CSF1R. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в части гена CSFR1, кодирующей внутриклеточный домен протеинтирозинкиназы. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в любом из экзонов 11-21 гена CSFR1. В некоторых вариантах осуществления индивид является гетерозиготным по мутации в гене CSFR1. В некоторых вариантах осуществления индивид является гомозиготным по мутации в гене CSFR1.

[0028] В некоторых вариантах осуществления индивид имеет или подвержен риску заболевания, выбранного из группы, состоящей из лейкоэнцефалопатии, повреждения аксонов, аксональных сфероидов, повреждения миелина, потери миелиновых оболочек, глиоза, аутофлуоресцентных макрофагов, нагруженных липидами, и разрушения аксонов. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет или подвергается риску развития симптома, выбранного из группы, состоящей из аномалии белого вещества головного мозга, изменений поведения, деменции, паркинсонизма, судорог, моторной афазии, аграфии, акалькулии, апраксии, брадикинезии, замедленных движений, демиелинизации ЦНС, депрессивности, депрессии, лобной деменции, глиоза, гиперрефлексии, повышенных рефлексов, подошвенного разгибательного рефлекса, гемипареза, квадрипареза, лейкоэнцефалопатии, нарушения памяти, забывчивости, потери памяти, проблем с памятью, плохой памяти, мутацизма, неспособности к активной речи, немоты, потери нейронов в центральной нервной системе, потери клеток головного мозга, постуральной неустойчивости, нарушения равновесия, быстрого прогрессирования,

ригидности, мышечной ригидности, шарканья, шаркающей походки, пирамидных симптомов, спастичности, непроизвольной ригидности мышц, непроизвольного сокращения мышц, непроизвольных мышечных спазмов, личностных проблем, центральной дисфункции.

[0029] В некоторых вариантах осуществления индивид имеет заболевание, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции (FTD), кортико-базального синдрома (CBS), кортико-базальной дегенерации (CBD), болезни Альцгеймера (AD), рассеянного склероза (MS), атипичной церебральной аутосомно-доминантной артериопатии с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) и болезни Паркинсона (PD).

[0030] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ мониторинга лечения индивида, которому вводят антитело к TREM2, включающий измерение уровня CSF1R в образце от индивида до и после того, как индивид получил одну или более доз антитела к TREM2. В некоторых вариантах осуществления способ включает стадию оценки активности антитела к TREM2 у индивида на основе уровня CSF1R в образце. В некоторых вариантах осуществления образец берется из спинномозговой жидкости индивида или крови индивида.

[0031] Должно быть понятно, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, могут быть объединены для формирования других вариантов реализации по данному изобретению. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно описаны в подробном описании, которое следует ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0032] **На Фиг. 1** показано влияние агонистического антитела к TREM2 на жизнеспособность макрофагов человека после удаления M-CSF. В частности, на Фиг. 1 показано кратность изменения жизнеспособности клеток макрофагов человека после удаления M-CSF. Закрашенные треугольники представляют собой макрофаги человека, обработанные только M-CSF (50 нг/мл), незакрашенные треугольники представляют макрофаги человека, обработанные IgG1 (10 мкг/мл), незакрашенные кружки представляют макрофаги человека, обработанные huIgG1 PSEG AL2p-58 (1 мкг/мл), а закрашенные кружки представляют макрофаги человека, обработанные huIgG1 PSEG AL2p-58 (10 мкг/мл). N=3 донора для каждого лечения; планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (СОС).

[0033] **На Фиг. 2** показано влияние агонистического антитела к TREM2 на жизнеспособность макрофагов человека после ингибирования рецептора CSF1 (CSF1R). В частности, на Фиг. 2 показано кратность изменения жизнеспособности макрофагов человека, обработанных ингибитором CSF1R (PLX3397). Закрашенные треугольники представляют собой макрофаги человека, обработанные только IgG1 (10 мкг/мл), незакрашенные треугольники представляют макрофаги человека, обработанные только



PLX3397 (30 нМ), незакрашенные кружки представляют макрофаги человека, обработанные только huIgG1 PSEG AL2p-58 (10 мкг/мл), и покрашенные кружки представляют макрофаги человека, обработанные как PLX3397 (30 нМ), так и huIgG1 PSEG AL2p-58 (10 мкг/мл). N=3 донора для каждого лечения; планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (СОС).

[0034] **На Фиг. 3** показан эффект агонистического антитела к TREM2 на экспрессию белка CSF1R у отличных от человека приматов. Показано изменение экспрессии белка CSF1R в образцах фронтального кортекса после обработки контрольным IgG или повышением концентрации huIgG1 PSEG AL2p-58; р-значения были рассчитаны с помощью t-критерия Стьюдента.

[0035] **На Фиг. 4** показана концентрация белка CSF1R во фронтальном кортексе и в гиппокампе отличных от человека приматов, которым вводили huIgG1 AL2p-58 или контроль. Отличным от человека приматам внутривенно вводили контроль или huIgG1 AL2p-58 один раз в неделю, всего 5 доз (N=5 на группу). Представлены концентрации белка CSF1R (нг белка CSF1R/мг общего белка) во фронтальном кортексе (левая панель) и в гиппокампе (правая панель) через 48 часов после пятого введения huIgG1 AL2p-58 или контроля.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0036] В данном документе предложены способы лечения нарушений и заболеваний, ассоциированных с дефицитами или другими дефектами сигналинга CSF1R, путем введения агониста TREM2. Такие заболевания или нарушения включают, но не ограничиваются ими, заболевания, ассоциированные с мутациями в CSF1R, такие как лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте; лейкоэнцефалопатия с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидами и пигментированной глией (ALSP); лейкоэнцефалопатия, диффузная наследственная, со сфероидами; лейкодистрофия с дебютом во взрослом возрасте с нейроаксональными сфероидами; аутосомно-доминантная лейкоэнцефалопатия с нейроаксональными сфероидами; наследственная диффузная лейкоэнцефалопатия с аксональными сфероидами (HDLS); нейроаксональная лейкодистрофия; пигментная ортохроматическая лейкодистрофия; и семейная пигментная ортохроматическая лейкоэнцефалопатия (POLD). Агонисты TREM2 включают антитела к TREM2, которые индуцируют одну или более активностей TREM2 и/или усиливают одну или более активностей, индуцированных связыванием одного или более лигандов с TREM2. Например, агонистические антитела к TREM2 могут снижать уровень растворимого TREM2, индуцировать фосфорилирование тирозинкиназы селезенки (Syk), индуцировать связывание TREM2 с DAP12, индуцировать фосфорилирование DAP12, повышать пролиферацию, выживаемость и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокласты, клетки Лангерганса в коже, клетки Купфера и микроглиальные клетки (микроглии) или повышают активность и/или экспрессию TREM2-зависимых генов.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0037] Используемый в данном документе термин *«предотвращение»* включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, включая задержку начала конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния у индивида, который может быть предрасположен, восприимчив к такому заболеванию, нарушению или патологическому состоянию или подвержен риску развития такого заболевания, нарушения или патологического состояния, но у которого еще не было диагностировано заболевание, нарушение или патологическое состояние.

[0038] В контексте данного документа индивид, *«подверженный риску»* развития конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, а также может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в данном документе. *«Подверженный риску»* означает, что у индивида есть один или более факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, как известно в данной области техники. Индивид, имеющий один или более из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, чем индивид без одного или более из этих факторов риска.

[0039] В контексте данного документа термин *«лечение»* относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного течения индивида, подвергающейся лечению, в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования, улучшение или облегчения патологического состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния. Индивид успешно *«лечится»*, например, если один или более симптомов, ассоциированных с конкретным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, смягчены или устранены.

[0040] *«Эффективное количество»* относится к по меньшей мере количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Эффективное количество может быть обеспечено за одно или более введений. Эффективное количество в контексте данного документа может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивида, а также способность лечения вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты лечения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Для профилактического применения, благоприятные или желаемые результаты включают устранение или снижение риска, уменьшение степени тяжести или задержку начала заболевания, в том числе биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствовавшие при развитии

заболевания. Для терапевтического применения полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или более симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни тех, страдающих от этого заболевания, снижение дозы других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного препарата, такое как замедление прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни. Эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понимается в клиническом контексте эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может или не может быть достигнуто в комбинации с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в контексте введения одного или более терапевтических агентов, и один агент может считаться введенным в эффективном количестве, если в сочетании с одним или более другими агентами может быть достигнут или достигается желаемый результат.

[0041] «*Особь/индивид*» в целях лечения, профилактики или снижения риска относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т. д. В некоторых вариантах осуществления индивид представляет собой человека.

[0042] Используемый в данном документе термин «*в сочетании*» с другим соединением или композицией включает одновременное введение и/или введение в разное время. Совместное введение также включает введение в виде совместного состава или введение в виде отдельных композиций, в том числе с различной частотой дозирования или интервалами, а также с использованием одного и того же пути введения или разных путей введения.

[0043] Используемый в данном документе термин «*иммуноглобулин*» (Ig) применяется взаимозаменяемо с термином «*антитело*». Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител, если они проявляют желаемую биологическую активность.

[0044] Основной единицей 4-цепочечного антитела является гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Спаривание  $V_H$  и  $V_L$  вместе образует антигенсвязывающий участок. Для получения информации о структуре и свойствах различных классов антител, см, например, Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram

G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

[0045] L-цепь, полученную от любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа («κ») и лямбда («λ»), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей (CH), иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены альфа («α»), дельта («δ»), эпсилон («ε»), гамма («γ») и мю («μ»), соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы (изотипы) на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например, в: Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4<sup>th</sup> ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

[0046] «Природные антитела» обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, хотя количество дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. На одном конце каждой тяжелой цепи находится переменный домен (V<sub>H</sub>), а затем - ряд константных доменов. На одном конце каждой легкой цепи находится переменный домен (V<sub>L</sub>), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область взаимодействия между переменными доменами легкой и тяжелой цепи.

[0047] «Выделенное» антитело, такое как выделенное антитело к TREM2 по настоящему изобретению, представляет собой антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или отделено от компонента его производственной среды (например, естественным или рекомбинантным путем). Предпочтительно, чтобы выделенный полипептид не ассоциировался практически со всеми другими загрязняющими компонентами из его продуцирующей среды. Контаминирующие компоненты его продуцирующей среды, такие как рекомбинантные трансфицированные клетки, представляют собой вещества, которые, как правило, препятствуют исследованию, диагностическому или терапевтическому применению антител и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид будет очищен: (1) до более 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах

осуществления до более 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, красителя на основе серебра.

[0048] «*Вариабельная область*» или «*вариабельный домен*» антитела, такого как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут быть обозначены как «V<sub>H</sub>» и «V<sub>L</sub>», соответственно. Как правило, эти домены являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки.

[0049] Термин «*вариабельный*» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных доменов сильно различаются по последовательности среди антител, таких как антитела к TREM2 по настоящему изобретению. Вариабельный домен опосредует антигенное связывание и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по всему диапазону вариабельных доменов. Напротив, вариабельность сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями (HVR). Более консервативные части вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый вариабельный домен природных легких и тяжелых цепей содержит четыре FR-области, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. HVR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и вместе с HVR из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности.

[0050] Используемый в данном документе термин «*моноклональное антитело*» относится к антителу, такому как моноклональное антитело к TREM2 по настоящему изобретению, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования и т.д.), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными на один антигенный участок. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают в себя разные антитела, направленные против

разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено на одну детерминанту антигена. В дополнение к их специфичности моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы гибридной культурой, по существу без загрязнения другими иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональное» указывает на то, что антитело получено из по существу однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включая, например, гибридный метод (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), технологии презентации дрожжами (см., например, WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568, и Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10): 663-70 (2013), и технологии получения человеческих или подобных человеческим антител у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулинов человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); патенты США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

[0051] Термины «*полноразмерное антитело*», «*интактное антитело*» или «*полное антитело*» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, в его практически интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, целые антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая область Fc. Константные домены могут быть константными доменами нативных последовательностей (например, константные домены нативных последовательностей человека) или их вариантами аминокислотных последовательностей. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или большее количество эффекторных функций.

[0052] «Фрагмент антитела» содержит часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающий и/или вариабельный участок интактного антитела. Примеры

фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и фрагменты Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0053] Расщепление папаином антител, таких как антитела к TREM2 по настоящему изобретению, дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами «Fab», и остаточный фрагмент «Fc», обозначение которого отражает способность легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab состоит из целой L-цепи вместе с доменом варибельной области H-цепи (VH), и первым константным доменом из одной тяжелой цепи (CH1). Каждый фрагмент Fab является моновалентным относительно связывания антигена, т.е., он имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который примерно соответствует двум фрагментам Fab, соединенным дисульфидной связью, которые способны связывать и сшивать антиген. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что имеют несколько дополнительных остатков на карбоксильном конце домена C<sub>H1</sub>, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH является обозначением для фрагмента Fab', в котором цистеиновые остатки константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты антител F(ab')<sub>2</sub> могут быть получены в виде пар фрагментов Fab' между которыми имеются шарнирные цистеины. Известны также другие варианты химического связывания фрагментов антител.

[0054] Фрагмент Fc содержит карбокситерминальные части обеих H-цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются по последовательностям в области Fc; эта область также является областью, которая распознается Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

[0055] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Этот фрагмент состоит из димера одного домена варибельной области тяжелой цепи и одного домена варибельной области легкой цепи, соединенных жесткой нековалентной связью. В результате фолдинга этих двух доменов получаются шесть гиперварибельных петель (по 3 петли из H и L-цепи), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антигенсвязывающую специфичность к антителу. В то же время даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных по отношению к антигену) может обладать способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низким сродством, чем полный сайт связывания.

[0056] «Одноцепочечный Fv» также сокращенно обозначаемый как «sFv» или «scFv» являются фрагментами антител, которые содержат домены VH и VL антител, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, позволяющий sFv образовывать структуру, необходимую для связывания с антигеном. Обзор по sFv см. у

Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-VerLAG-3, New York, pp. 269-315 (1994).

[0057] «Функциональные фрагменты» антител, таких как антитела к TREM2 по настоящему изобретению, содержат часть интактного антитела, обычно содержащую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или область Fc антитела, которая сохраняет или модифицировал способность связывания FcR.

[0058] Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител, полученным путем конструирования фрагментов sFv (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (около 5-10 остатков) между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , так что достигаются межцепочечное, но не внутрицепочечное спаривание переменных доменов, в результате чего получается двухвалентный фрагмент, то есть фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993).

[0059] Используемый в данном документе термин «химерное антитело» относится к антителу, такому как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984)). Химерные антитела включают антитела, в которых переменная область антитела получена из мышинового антитела, а константная область получена из человеческого антитела. В данном контексте термин «гуманизированное антитело» применяется для обозначения подмножества «химерных антител».

[0060] «Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител, такие как гуманизированные формы антител к TREM2 по настоящему изобретению, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменяют остатками из HVR видов нечеловеческого происхождения (донорское антитело), например, мыши, крысы, кролика или отличного от человека примата, при этом антитело обладает желательной специфичностью, аффинностью и/или активностью. В некоторых случаях, остатки FR человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации можно осуществить для дальнейшего уточнения характеристик антител, таких как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело содержит по



существо все или по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют гиперпеременным петлям последовательности иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все области FR представляют собой такие области, которые относятся к последовательности иммуноглобулина человека, тем не менее области FR могут включать одну или более замен отдельных остатков FR, что улучшает характеристики антител, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.п. Количество таких аминокислотных замен в FR обычно не превышает 6 в H-цепи, а в L-цепи не более 3. В некоторых случаях гуманизованное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см., например, в публикациях Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США № 6982321 и 7087409.

[0061] «Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, такого как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, которое было получено с использованием любого из способов получения человеческих антител, описанных в данном документе, или иным способом, известным в данной области техники. Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизованное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных методик известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Кроме того, моноклональные антитела человека можно получить с помощью способов, описанных в публикациях Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также публикацию van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы указанного животного отключены, например, иммунизированных ксеномышей (о технологии XENOMOUSE<sup>TM</sup> см., например, патенты США № 6075181 и 6150584). Кроме того, информацию об антителах человека, полученных посредством технологии В-клеточных гибридом человека, см., например, в публикации Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). В качестве альтернативы антитела человека также могут быть получены с использованием дрожжевых библиотек и способов, как описано, например, в публикациях WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568; and Xu et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10): 663-70 (2013).

[0062] Термин «гиперпеременная область», или «HVR» в контексте данного

документа относится к областям вариабельного домена антитела, таким как область антитела к TREM2 по данному изобретению, которые являются гипервариабельными в последовательность и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и, в частности, считается, что H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. См., например, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Фактически, природные антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) и Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[0063] Ряд описаний HVR применяется и охватывается в данном документе. В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat, в основе которых лежит вариабельность последовательностей и которые являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., *выше*). В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой CDR по Chothia. Нумерация по Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой HVR по AbM. HVR по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой HVR по «Contact». HVR по «Contact» основан на анализе имеющихся комплексов кристаллических структур. Остатки от каждого из этих HVR отмечены ниже.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Contact	
L1	L24-L34		L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56		L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97		L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B		H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация Kabat)
H1	H31-H35		H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация Chothia)
H2	H50-H65		H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102		H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0064] HVR могут включать «расширенные HVR» следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2), и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26- 35 (H1), 50-65 или 49-65 (предпочтительный вариант) (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельного домена пронумерованы в соответствии с Kabat et al., см. выше, для каждого из этих определений расширенной HVR.

[0065] «Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

[0066] Фраза «нумерация остатков переменных доменов по Kabat» или «нумерация положений аминокислот по Kabat» и их вариации, относятся к системе нумерации, применяемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., выше. При применении этой системы нумерации конкретная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорачиванию или вставке в FR или HVR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может содержать себя инсерцию одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после 52 остатка в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Kabat) после 82 остатка FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания гомологичных областей последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной последовательностью по Kabat.

[0067] Система нумерации по Kabat, как правило, используется для обозначения остатка в переменном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Как правило, «система нумерации EU» или «индекс EU» применяется, когда речь идет об остатке в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный в Kabat et al., выше). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации аминокислотных остатков человеческого антитела IgG1 EU. Ссылки на номера остатков в переменном домене антител означают нумерацию остатков согласно системе нумерации Kabat. Ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU (например, см. публикацию патента США № 2010-280227).

[0068] «Акцепторная каркасная область человека», как используется в данном документе, представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, полученную из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, «полученная из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же самую аминокислотную последовательность, как и указанная, или может содержать ранее существовавшие изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее. Когда в VH присутствуют ранее существовавшие аминокислотные замены, предпочтительно эти замены происходят только в трех, двух или одном из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в этих положениях могут представлять собой 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления последовательность человеческой акцепторной каркасной области VL последовательности каркасной области VL иммуноглобулина человека или

консенсусной последовательности каркасной области человека.

[0069] «*Консенсусная каркасная область человека*» является структурой, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в отборе каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, последовательности VL или VH иммуноглобулина человека выбирают из последовательностей подгруппы переменных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей является подгруппой, как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Для VL подгруппа может быть, например, подгруппой каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, как у Kabat et al., *выше*. Кроме того, для VH подгруппа может быть, например, подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III, как в Kabat et al., *выше*.

[0070] «*Аминокислотная модификация*» в определенном положении, например, антитела к TREM2 по настоящему изобретению относится к замене или делеции указанного остатка или вставке по меньшей мере одного аминокислотного остатка, смежного до указанного остатка. Термин «вставка, смежная с указанным остатком» означает вставку в пределах одного-двух остатков. Вставка может быть N-концевой или C-концевой относительно указанного остатка. Предпочтительная модификация аминокислоты в настоящем изобретении представляет собой замену.

[0071] Антитело с «*созревшей аффинностью*», такое как антитело к TREM2 с созревшей аффинностью по настоящему изобретению, представляет собой антитело с одним или более изменениями в одной или более его HVR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим этих изменений(-я). В одном варианте осуществления антитело с созревшей аффинностью обладает наномолярными или даже пикомолярными значениями аффинности к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью могут быть получены способами, известными в данной области техники. Например, в Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описано созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков HVR и/или каркасных остатков описан, например, в публикациях: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0072] Используемый в данном документе термин «*специфически связывается*» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям связывания между мишенью и антителом, например, между антителом к TREM2 и TREM2, которое определяет присутствие мишени в гетерогенной популяции молекул, таких как биологические молекулы. Например, антитело, такое как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, которое специфически связывается с мишенью или эпитопом мишени, представляет собой антитело, которое предпочтительно связывает эту мишень или эпитоп, например, с большей аффинностью или авидностью, чем он связывается с другими неродственными мишенями или эпитопами. Также понятно, что антитело,

которое специфически связывается с первой мишенью, может специфически связываться или не связываться со второй мишенью. Таким образом, «специфическое связывание» не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. Антитело, которое специфически связывается с мишенью, может иметь константу ассоциации по меньшей мере около  $10^3 \text{ M}^{-1}$  или  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , иногда около  $10^5 \text{ M}^{-1}$  или  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , в других случаях около  $10^6 \text{ M}^{-1}$  или  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , от около  $10^8 \text{ M}^{-1}$  до  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , или от около  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  до  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  или выше. Для выбора антител, специфически иммунореактивных с конкретным белком, можно использовать различные форматы иммунологических анализов. Например, твердофазные иммуноанализы ИФА обычно применяются для отбора моноклональных антител, специфически иммунореактивных с белком. См., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, или Vashist and Luong (2018) *Handbook of Immunoassay Technologies, Approaches, Performances, and Applications*, Academic Press, для описания форматов иммуноанализа и условий, которые могут быть применены для определения специфической иммунореактивности.

[0073] В данном контексте антитело «ингибирует взаимодействие» между двумя белками, когда антитело разрушает, уменьшает или полностью устраняет взаимодействие между двумя белками путем связывания с одним из двух белков.

[0074] «Агонистическое» антитело представляет собой антитело, которое индуцирует (например, усиливает) одну или более активностей или функций мишени при связывании с мишенью.

[0075] «Антагонистическое» антитело или «блокирующее» антитело представляет собой антитело, которое уменьшает или устраняет (например, уменьшает) связывание антигена с одним или более партнерами по связыванию после того, как антитело связывает антиген, и/или которое снижает или устраняет (например, уменьшает) одну или более активностей или функций антигена после того, как антитело связывает антиген. В некоторых вариантах осуществления антитела-антагонисты или блокирующие антитела существенно или полностью ингибируют связывание антигена с одним или более партнерами по связыванию и/или одну или более активностей или функций антигена.

[0076] «Эффекторные функции антитела» относятся к видам биологической активности, обусловленным областью Fc (нативной последовательностью области Fc или вариантом аминокислотной последовательности области Fc) антитела, и варьируются в зависимости от изоформа антитела.

[0077] Термин «область Fc» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc с нативной последовательностью и вариантные области Fc. Несмотря на то, что границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как растянутая из аминокислотного остатка в положении Cys226 или из Pro230 по направлению к ее карбоксильному концу. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален,

например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител, в которых удалены все остатки К447, популяции антител, в которых не удалены остатки К447, и популяции антител, содержащие смесь из антител с остатком К447 и без него. Подходящие области Fc с нативной последовательностью для применения в антителах по настоящему изобретению включают области из человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0078] «Область Fc с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. Нативная последовательность областей Fc человека включают нативную последовательность области Fc IgG1 человека (аллотипы не А и А); нативную последовательность области Fc IgG2 человека; нативную последовательность области Fc IgG3 человека; и нативную последовательность области Fc IgG4 человека, а также существующие в природе варианты указанных последовательностей.

[0079] «Вариант области Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от таковой у природной последовательности области Fc в силу по меньшей мере одной аминокислотной модификации, предпочтительно одной или более аминокислотных(-ой) замен(-ы). Предпочтительно вариант области Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с областью Fc с нативной последовательностью, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в области Fc с нативной последовательностью. Вариант области Fc в данном документе будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологии с областью Fc нативной последовательности и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологии с ним, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологии с ним.

[0080] Термин «Fc-рецептор» или «FcR» описывает рецептор, который связывается с областью Fc антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся, прежде всего, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина («ITAM»). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) (см. обзор M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены в публикациях Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel

et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); and de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Другие FcR охватываются термином «FcR» в данном документе. FcR также могут увеличивать период полужизни антител из сыворотки.

[0081] Связывание с FcR *in vivo* и период полужизни в сыворотке высокоаффинных связывающих полипептидов FcR человека можно анализировать, например, на трансгенных мышях или трансфицированных линиях клеток человека, экспрессирующих человеческий FcR, или у приматов, которым вводят полипептиды, имеющие вариант области Fc. В WO 2004/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

[0082] Используемые в данном документе термины «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» и «гомология» в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела относится к проценту аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения наибольшего процента идентичности последовательности и не считая любые консервативные замены частью идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для выравнивания, включая любые известные в данной области техники алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0083] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, например, кодирующая антитело, такое как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицируется и отделяется от по меньшей мере одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она была произведена. Предпочтительно выделенная нуклеиновая кислота не связана по существу со всеми компонентами, связанными со средой продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды и антитела по настоящему изобретению, отличаются от нуклеиновых кислот, существующих в естественных условиях в клетках.

[0084] Термин «вектор» в контексте данного документа обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, с ней соединенную. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты

ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, не-эписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «рекомбинантными векторами экспрессии» или просто «векторами экспрессии». Как правило, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В данном описании изобретения «плазида» и «вектор» могут быть взаимозаменяемы, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

[0085] «Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам 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 полимер ДНК- или РНК-полимеразой или с помощью синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если имеет место, то модификация структуры нуклеотида может быть внесена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может содержать модификацию(-и), сделанную(-ые) после синтеза, такую как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэп», замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, и межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т. д.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т. д.), содержащие боковые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, pty-L-лизин и т. д.), с интеркаляторами (например, акридином, псораленом и т. д.), с хелаторами (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т. д.), с алкиляторами, с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т. д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида (ов). Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть заменена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами или активирована для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами или может быть конъюгирована с полутвердыми носителями. 5' и 3'-концы ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или частями органической кепирующей группы от 1 до 20 атомов углерода. Другие



гидроксилы также могут быть производными до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые широко известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибоза, аналоги карбоциклических сахаров,  $\alpha$ -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и основные аналоги нуклеозидов, такие как метилрибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связующими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваются ими, варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), «(O)NR<sub>2</sub> («амидат»)), P(O)R, P(O)OR', CO или CH<sub>2</sub> («формацеталь»), в котором каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде обязательно должны быть идентичными. Предыдущее описание относится ко всем полинуклеотидам, указанным в данном документе, включая РНК и ДНК.

[0086] «Клетка-хозяин» включает отдельную клетку или культуру клеток, которая может содержать или содержит вектор(-ы) или другую экзогенную нуклеиновую кислоту, например, которая включает полинуклеотидную вставку(-и). В некоторых вариантах осуществления вектор или другая экзогенная нуклеиновая кислота включены в геном клетки-хозяина. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие природных, случайных или умышленных мутаций. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(-ами) по настоящему изобретению.

[0087] В данном контексте термин «носители» включают в себя фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающих, подвергающихся их воздействию при применяемых дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный рН-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™.

[0088] Термин «около», используемый в данном документе, относится к обычному

диапазону погрешностей для соответствующего значения и хорошо известный специалисту в данной области техники. Ссылка на «около» значения или параметра включает в себя (и описывает) варианты осуществления по данному документу, которые направлены на это значение или параметр как таковой.

[0089] В данном документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, ссылка на «антитело» представляет собой ссылку на от одного до многих антител, такую как молярные количества, и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

[0090] Понятно, что аспект и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и варианты «содержащий», «состоящий» и «состоящий по существу из».

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0091] В настоящем изобретении предлагаются способы лечения, предотвращения или снижения риска у индивида, имеющего обусловленное дефицитом CSF1R заболевание, включающие введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с белком TREM2, при этом антитело представляет собой агонист.

[0092] В контексте данного документа «обусловленное дефицитом CSF1R заболевание» относится к любому заболеванию, нарушению или патологическому состоянию, возникающему в результате недостаточности или других дефектов в сигналинге CSF1R. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние включают белок CSF1R с пониженной функцией по сравнению с белком CSF1R, который, как считается, обладает функцией «дикого типа» или имеет функцию, которая считается находящейся в пределах нормы. В некоторых вариантах осуществления обусловленные дефицитом CSF1R заболевания характеризуются мутацией в гене CSF1R у пораженного индивида. Мутация обычно приводит к снижению функции CSF1R у пораженной индивида. Мутация может быть любого типа, включая, например, миссенс-мутацию, индел или мутацию, которая приводит к образованию усеченного белка.

[0093] Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что агонизация TREM2 улучшит последствия дефицита CSF1R у индивида, имеющего обусловленное дефицитом CSF1R заболевание. В определенных вариантах осуществления антитело к TREM2, как описано в данном документе, может активировать или усиливать нисходящий сигналинг CSF1R, чтобы компенсировать или иным образом восстановить дефицит CSF1R. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2, как описано в данном документе, может индуцировать или повышать экспрессию CSF1R, который является дефицитным в отношении сигналинга, при этом увеличение количества такого CSF1R приводит к достаточному повышению сигналинга.

[0094] Обусловленные дефицитом CSF1R заболевания включают, помимо прочего,

лейкоэнцефалопатию с дебютом в детском возрасте и лейкоэнцефалопатию с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидами и пигментированной глией (ALSP). В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой ALSP. В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой лейкоэнцефалопатию с дебютом в детском возрасте.

*Лейкоэнцефалопатия с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидами и пигментированной глией*

[0095] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы лечения, предотвращения или снижения риска у индивида с ALSP, включающие введение нуждающейся в этом индивида терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с белком TREM2, при этом антитело представляет собой агонист.

[0096] Лейкоэнцефалопатия с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидами и пигментированной глией (ALSP) представляет собой аутосомно-доминантное неврологическое заболевание, характеризующееся изменениями в определенных областях головного мозга. ALSP вызывается мутацией в гене, кодирующем CSF1R. «Лейкоэнцефалопатия», поражение белого вещества головного мозга, является классической характеристикой ALSP. Кроме того, повреждение аксонов, вызванное отеком, называемым сфероидами, является еще одной общей характеристикой ALSP. Дополнительные общие характеристики болезни ALSP включают повреждение миелина, потерю миелиновых оболочек, глиоз, аутофлуоресцентные макрофаги, нагруженные липидами, и разрушение аксонов. Кроме того, считается, что повреждение миелина и аксонов способствует многочисленным неврологическим признакам и симптомам у индивидов, страдающих ALSP (Oosterhof et al; Rademaker et al, Guo et al, 2019).

[0097] Общие симптомы ALSP включают, помимо прочего, аномалии белого вещества головного мозга, изменения поведения, деменцию, паркинсонизм, судороги, моторную афазию, аграфию, акалькулию, апраксию, брадикинезию, замедленные движения, демиелинизацию ЦНС, депрессивность, депрессию, лобную деменцию, глиоз, гиперрефлексию, повышенные рефлексы, подошвенный разгибательный рефлекс, гемипарез, квадрипарез, лейкоэнцефалопатию, нарушение памяти, забывчивость, потерю памяти, проблемы с памятью, плохую память, мутацизм, неспособность к активной речи, немоту, потерю нейронов в центральной нервной системе, потерю клеток головного мозга, постуральную неустойчивость, нарушение равновесия, быстрое прогрессирование, ригидность, мышечную ригидность, шарканье, шаркающую походку, пирамидные симптомы, спастичность, непроизвольную ригидность мышц, непроизвольное сокращение мышц, непроизвольные мышечные спазмы, личностные проблемы, центральную дисфункцию.

[0098] Ранее считалось, что заболевание, которое сейчас называют ALSP, представляет собой два разных заболевания: наследственную диффузную

лейкоэнцефалопатию с аксональными сфероидными (HDLS) и семейную пигментную ортохроматическую лейкоэнцефалопатию (POLD). Действительно, практикующие врачи считали, что пигментированные глиальные клетки являются признаком POLD, а не HDLS. Кроме того, практикующие врачи считали, что сфериды являются признаком HDLS, но не POLD. Однако детальный анализ клинических и патологических особенностей каждого заболевания продемонстрировал, что у пациентов с HDLS и POLD присутствуют пигментированные глиальные клетки и сфериды. Таким образом, HDLS и POLD теперь считаются частью одного и того же спектра заболеваний, охватываемых ALSP (Nicholson et al. (2013)).

[0099] Примеры альтернативных названий для ALSP включают, но не ограничиваясь этим, лейкоэнцефалопатия, диффузная наследственная, со сфероидными; лейкодистрофия с дебютом во взрослом возрасте с нейроаксональными сфероидными; аутосомно-доминантная лейкоэнцефалопатия с нейроаксональными сфероидными; наследственная диффузная лейкоэнцефалопатия с аксональными сфероидными (HDLS); нейроаксональная лейкодистрофия; пигментная ортохроматическая лейкодистрофия; и семейная пигментная ортохроматическая лейкоэнцефалопатия (POLD).

[00100] В некоторых вариантах осуществления введение агонистического антитела к TREM2 может предотвратить, снизить риск и/или лечить лейкоэнцефалопатию с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP). В некоторых вариантах осуществления введение антитела к TREM2 индуцирует одну или более активностей TREM2 у индивида с лейкоэнцефалопатией с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP). Не желая быть связанными теорией, считается, что агонизация TREM2 уменьшит эффекты дефицита CSF1R у человека с ALSP.

*Лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте*

[0101] Лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте представляет собой редкое неврологическое заболевание со смертельным исходом, вызванное мутациями в гене CSF1R. Лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте характеризуется различными педиатрическими фенотипами, включая: 1) регресс развития, 2) проблемы с двигательными навыками в дебюте, 3) эпилепсию и 4) снижение когнитивных функций. Недавние исследования демонстрируют, что по сравнению с ALSP, который вызывается гетерозиготными мутациями в гене CSF1R, у индивидов, страдающих лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте, имеются гомозиготные мутации в гене CSF1R. Кроме того, несмотря на то, что у индивидов с лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте многие особенности нейровизуализации совпадают с ALSP, у них также есть различные особенности нейровизуализации, которых нет у индивидов с ALSP (Oosterhof et al. (2019)).

[0102] В некоторых вариантах осуществления введение агонистического антитела к TREM2 может предотвращать, снижать риск и/или лечить лейкоэнцефалопатию с дебютом в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления введение антитела к

TREM2 индуцирует одну или более активностей TREM2 у индивида с лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что агонизация TREM2 уменьшит эффекты дефицита CSF1R у человека с лейкоэнцефалопатией с дебютом в детском возрасте.

#### *Мутации CSF1R*

[0103] В некоторых вариантах осуществления у индивида с обусловленным дефицитом CSF1R, имеется мутация в гене CSF1R. Как подробно описано выше, человеческий ген CSF1R кодирует рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R). CSF1R также может обозначаться одним из следующих названий: *C-FMS*, *CD115*, *антиген CD115*, *рецептор CSF-1*, *CSF-1R*, *CSF1R\_HUMAN*, *CSFR*, *FIM2*, *FMS*, *протоонкоген FMS*, *CSF-1-R*, *M-CSF-R*, *BANDDOS*, *v-FMS*, и протоонкоген *c-FMS*. Хромосомное расположение гена CSF1R - 5q32, а его молекулярное расположение - пары оснований от 150 053 291 до 150 113 372 на хромосоме 5. Кроме того, идентификатор GenBank для гена CSF1R - NG\_012303.

[0104] Белок CSF1R представляет собой тирозинкиназный рецептор фактора роста III типа, принадлежащий к семейству рецепторов PDGF. В частности, CSF1R состоит из высокогликозилированного внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного домена протеинтирозинкиназы. CSF1R представляет собой рецептор клеточной поверхности, который действует как рецептор в первую очередь для CSF-1, цитокина, который регулирует выживаемости, пролиферацию, дифференцировку и функцию мононуклеарных фагоцитирующих клеток, включая макроглию. Связывание CSF-1 с CSF1R приводит к образованию гомодимеров рецептора и последующему аутофосфорилированию нескольких остатков тирозина в цитоплазматическом домене.

[0105] Для идентификации мутаций в гене CSF1R можно использовать любой метод секвенирования, известный в данной области техники. Например, неполный список методов секвенирования, которые можно использовать для идентификации мутаций CSF1R, включает секвенирование по Сэнгеру, полноэкзомное секвенирование и секвенирование нового поколения.

[0106] В некоторых вариантах осуществления мутация в гене CSF1R находится в части гена, кодирующей домен внутриклеточной протеинтирозинкиназы. В некоторых вариантах осуществления мутация в гене CSF1R происходит в любом из экзонов 11-21. В некоторых вариантах осуществления индивид с обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием является гетерозиготным по мутации в гене CSF1R. В некоторых вариантах осуществления индивид с заболеванием, вызванным дефицитом CSF1R является гомозиготным по мутации в гене CSF1R. В некоторых вариантах осуществления мутация в гене CSF1R находится в части гена, кодирующей иммуноглобулиноподобный домен. В некоторых вариантах осуществления мутация в гене CSF1R находится в части гена, кодирующей трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления мутация в гене CSF1R находится в части гена, кодирующей регуляторный околосмембранный домен.

[0107] Примеры мутаций в гене CSF1R включают, но не ограничиваясь этим, с.1754-2A>G (p.G585\_K619delinsA), с.1766G>A (p.G589E), с.1897G>A (p.E633K), с.2297T>C (p.M766T), с.2308G>C (p.A770P), с.2320-2A>G (p.C774\_N814del), с.2324T>A (p.I775N), с.2381T>C (p.I794T), с.2442+5G>C (p.C774\_N814delinsQGLQSHVGPSPSSPQAQ), с.2509G>T (p.D837Y), с.2546\_2548delTCT (p.F849del), с.2546T>C (p.F849S), с.2603T>C (p.L868P), с.2624T>C (p.M875T), и с.2632C>A (p.P878T) (Oosterhof et al; Rademaker et al.).

[0108] В некоторых вариантах осуществления введение антитела к TREM2 по настоящему изобретению может предотвратить, снизить риск и/или лечить обусловленное дефицитом CSF1R заболевание, вызванное мутантным вариантом CSF1R. В некоторых вариантах осуществления введение антитела к TREM2 может индуцировать одну или более активностей TREM2 у индивида с обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием, вызванным мутантным вариантом CSF1R.

#### *Сопутствующие заболевания*

[0109] Особи с обусловленным дефицитом CSF1R заболеваниями могут страдать и/или у них были диагностированы дополнительные заболевания, такие как, например, лобно-височная деменция (FTD), кортико-базальный синдром (CBS), кортико-базальная дегенерация (CBD), болезнь Альцгеймера (AD), рассеянный склероз (MS), атипичная церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) и болезнь Паркинсона (PD).

#### **Белки TREM2**

[0110] В настоящем изобретении предложены способы лечения, предотвращения или снижения риска у индивида, страдающего обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием, включающие введение индивиду антитела, которое связывается с белком TREM2, при этом антитело представляет собой агонист.

[0111] Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-2 (TREM2), по-разному обозначается как TREM-2, TREM2a, TREM2b, TREM2c, триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-2a, и триггерный рецептор, экспрессируемый на моноцитах-2. TREM2 представляет собой мембранный белок из 230 аминокислот. TREM2 представляет собой иммуноглобулин-подобный рецептор, в основном экспрессируемый на клетках миелоидного происхождения, включая, помимо прочего, макрофаги, дендритные клетки, моноциты, клетки Лангерганса в коже, клетки Купфера, остеокласты и микроглию. В некоторых вариантах осуществления TREM2 образует рецепторный сигнальный комплекс с DAP12. В некоторых вариантах осуществления TREM2 фосфорилирует и передает сигналы через DAP12 (адаптерный белок, содержащий домен ITAM). В некоторых вариантах осуществления сигналинг TREM2 приводит к последующей активации PI3K или других внутриклеточных сигналов. На миелоидных клетках сигналы Toll-подобного рецептора (TLR) важны для активации активности TREM2, например, в контексте ответа на инфекцию. TLR также играют ключевую роль в патологическом воспалительном ответе, например, TLR, экспрессируемые в макрофагах и

дендритных клетках.

[0112] Белки TREM2 по настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь этим, белок TREM2 человека (номер доступа в базе данных Uniprot Q9NZC2; SEQ ID NO: 1) и белок TREM2 отличного от человека млекопитающего, такой как белок TREM2 мыши (номер доступа в базе данных Uniprot Q99NH8; SEQ ID NO: 2), белок TREM2 крысы (номер доступа в базе данных Uniprot D3ZZ89; SEQ ID NO: 3), белок TREM2 макаки-резуса (номер доступа в базе данных Uniprot F6QVF2; SEQ ID NO: 4), белок TREM2 яванского макака (номер доступа в базе данных NCBI, XP\_015304909.1; SEQ ID NO: 5), белок TREM2 лошади (номер доступа в базе данных Uniprot F7D6L0; SEQ ID NO: 6), белок TREM2 свиньи (номер доступа в базе данных Uniprot H2EZZ3; SEQ ID NO: 7) и белок TREM2 собаки (номер доступа в базе данных Uniprot E2RP46; SEQ ID NO: 8). Используемый в данном документе термин «белок TREM2» относится как к последовательностям дикого типа, так и к встречающимся в природе вариантным последовательностям.

[0113] В некоторых вариантах осуществления пример аминокислотной последовательности TREM2 человека приведен ниже как SEQ ID NO: 1:

```

      10      20      30      40      50      60
MEPLRLILL FVTELSGANH TTVFQGVAGQ SLQVSCPYS MKHWGRRKAW CRQLGKGP
      70      80      90      100     110     120
QRVVSTHNLW LLSFLRRWNG STAITDDTLG GTLTITLRNL QPHDAGLYQC QSLHGSEADT
      130     140     150     160     170     180
LRKVLVEVLA DPLDHRDAGD LWFPGESESF EDANVEHSIS RSLLEGEIPF PPTSILLLLA
      190     200     210     220     230
CIFLIKILAA SALWAAAHNG QKPGTHPPSE LDCGHDPGYQ LQTLPLGRDT

```

[0114] В некоторых вариантах осуществления человеческий TREM2 представляет собой белок-предшественник, который включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления TREM2 человека представляет собой зрелый белок. В некоторых вариантах осуществления зрелый белок TREM2 не содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления зрелый белок TREM2 экспрессируется на клетке. В некоторых вариантах осуществления TREM2 содержит сигнальный пептид, расположенный в аминокислотных остатках 1-18 человеческого TREM2 (SEQ ID NO: 1); внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен варибельного типа (IgV), расположенный в аминокислотных остатках 29-112 человеческого TREM2 (SEQ ID NO: 1); дополнительные внеклеточные последовательности, расположенные в аминокислотных остатках 113-174 человеческого TREM2 (SEQ ID NO: 1); трансмембранный домен, расположенный в аминокислотных остатках 175-195 человеческого TREM2 (SEQ ID NO: 1); и внутриклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 196-230 человеческого TREM2 (SEQ ID NO: 1). Было идентифицировано, что сайт расщепления TREM2 находится на С-концевой стороне гистидина 157 (см. WO 2018/015573), и расщепление в этом сайте приводит к отщеплению

соответствующей части внеклеточного домена TREM2, что обнаруживается как увеличение растворимого TREM2. (sTREM2), соответствующий той части TREM2.

[0115] Трансмембранный домен TREM2 человека содержит лизин по аминокислотному остатку 186, который может взаимодействовать с аспарагиновой кислотой в DAP12, который является ключевым адаптерным белком, который трансдуцирует сигналы от TREM2, TREM1 и других родственных членов семейства IgV.

#### **Антитела к TREM2**

[0116] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к антителам (например, моноклональным антителам), которые связываются с белком TREM2, причем антитело к TREM2 представляет собой агонист. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связывают зрелый белок TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связывают зрелый белок TREM2, при этом зрелый белок TREM2 экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связывают белок TREM2, экспрессированный на одной или более клетках человека, выбранных из дендритных клеток человека, макрофагов человека, моноцитов человека, остеокластов человека, человеческих клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера человека, микроглии человека, и любые их комбинации.

#### **Антитела к TREM2, которые индуцируют активность и/или усиливают индуцированную лигандом активность**

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 по настоящему изобретению представляет собой агонистическое антитело, которое индуцирует одну или более активностей TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует одну или более активностей TREM2 после связывания с белком TREM2, который экспрессируется на клетке.

[0118] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению связываются с белком TREM2, не конкурируя, не ингибируя или иным образом не блокируя связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2. Примеры лигандов TREM2 включают, но не ограничиваясь этим, лиганды TREM2, экспрессируемые клетки *E. coli*, апоптотические клетки, нуклеиновые кислоты, анионные липиды, APOE, APOE2, APOE3, APOE4, анионный APOE, анионный APOE2, анионный APOE3, анионный APOE4, липидированный APOE, липидированный APOE2, липидированный APOE3, липидированный APOE4, цвиттерионные липиды, отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилсерин, сульфатиды, фосфатидилхолин, сфингомиелин, мембранные фосфолипиды, липидированные белки, протеолипиды, липидированные пептиды и липидированные бета-амилоидные пептиды. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления один или более лигандов TREM2 содержат клетки *E. coli*, апоптотические клетки, нуклеиновые кислоты, анионные липиды, цвиттерионные липиды, отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилсерин (PS), сульфатиды, фосфатидилхолин, сфингомиелин (SM), фосфолипиды, липидированные белки,



протеолипиды, липидированные пептиды и липидированный бета-амилоидный пептид.

[0119] Антитела к TREM2, используемые в способах по настоящему изобретению, представляют собой агонистические антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению, которые связывают белок TREM2, могут включать агонистические антитела, которые благодаря своей специфичности к эпитопу связывают TREM2 и активируют одну или более активностей TREM2. В некоторых вариантах осуществления такие антитела могут связываться со связывающим лиганд сайтом на TREM2 и имитировать действие одного или более лигандов TREM2 или стимулировать TREM2 к передаче сигнала путем связывания с одним или более доменами, которые не являются связывающими лиганд сайтами. В некоторых вариантах осуществления антитела не конкурируют или иным образом не блокируют связывание лиганда с TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела действуют аддитивно или синергически с одним или более лигандами TREM2, активируя и/или усиливая еще одну активность TREM2, как указано ниже.

[0120] Агонистические антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут проявлять способность связывать TREM2, не блокируя одновременное связывание одного или более лигандов TREM2. Антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут дополнительно проявлять аддитивные и/или синергические функциональные взаимодействия с одним или более лигандами TREM2. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления максимальная активность TREM2 при связывании с антителами к TREM2 по настоящему изобретению в комбинации с одним или более лигандами TREM2 по настоящему изобретению может быть выше (например, усиленной), чем максимальная активность TREM2 при воздействии насыщающих концентраций одного лиганда или насыщающих концентраций одного антитела. Кроме того, активность TREM2 при данной концентрации лиганда TREM2 может быть выше (например, усилена) в присутствии антитела.

[0121] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению обладают аддитивным действием с одним или более лигандами TREM2 для усиления одной или более активностей TREM2 при связывании с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению синергически действуют с одним или более лигандами TREM2 для усиления одной или более активностей TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению повышают активность одного или более лигандов TREM2 в отношении индукции одной или более активностей TREM2 по сравнению с активностью одного или более лигандов TREM2 для индукции одной или более активностей TREM2 в отсутствие антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению усиливают одну или более активностей TREM2 в отсутствие кластеризации TREM2 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению усиливают одну или более активностей TREM2, индуцируя или сохраняя кластеризацию TREM2 на

клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению кластеризованы одним или более Fc-гамма рецепторами, экспрессированными на одной или более иммунных клетках, включая, помимо прочего, В-клетки и клетки микроглии. В некоторых вариантах осуществления усиление одной или более активностей TREM2, индуцированное связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2, измеряют на первичных клетках, включая, помимо прочего, дендритные клетки, дендритные клетки костного мозга, моноциты, микроглию, макрофаги, нейтрофилы, NK-клетки, остеокласты, клетки Лангерганса в коже и клетки Купфера или на линиях клеток.

[0122] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 по настоящему изобретению, которое усиливает одну или более активностей TREM2, индуцированных связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2, индуцирует по меньшей мере 2-кратное, по меньшей мере 3-кратное, по меньшей мере не менее 4-кратное, не менее 5-кратное, не менее 6-кратное, не менее 7-кратное, не менее 8-кратное, не менее 9-кратное, не менее 10-кратное, не менее 11-кратное, не менее 12-кратное, не менее 13-кратное, не менее 14-кратное, не менее 15-кратное, не менее 16-кратное, не менее 17-кратное, не менее 18-кратное, по меньшей мере 19-кратное, по меньшей мере 20-кратное или более увеличение одной или более активностей TREM2 по сравнению с уровнями одной или более активностей TREM2, индуцированных связыванием одного или более лигандов TREM2 с TREM2 белком в отсутствие антитела к TREM2.

[0123] В некоторых вариантах осуществления активность TREM2, которая может быть индуцирована и/или усилена антителами к TREM2 по настоящему изобретению и/или одним или более лигандами TREM2 по настоящему изобретению, включает, но не ограничиваясь этим, связывание TREM2 с DAP12; фосфорилирование DAP12; активацию киназы Syk; модулирование одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , YM-1, IL-6, IL-8, CRP, CD86, MCP-1/CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CXCL-10, Gata3, Rorc, члены семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, GM-CSF, CSF-1, MHC-II, OPN, CD11c, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 и IL-23, необязательно, при этом модуляция происходит в одной или более клетках, выбранных из макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и микроглиальных клеток; рекрутирование Syk, ZAP70 или обоих в комплекс DAP12/TREM2; повышение активности одного или более TREM2-зависимых генов, необязательно, когда один или более TREM2-зависимых генов содержат факторы транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT); повышение выживаемости дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера, микроглии, микроглии M1, активированной микроглии M1 и микроглии M2 или любой их комбинации; модулированную экспрессию одной или более стимулирующих молекул, выбранных из CD83, CD86 MHC класса II, CD40 и любой их

комбинации, необязательно, когда CD40 экспрессируется на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах или любой их комбинации, и необязательно, когда дендритные клетки содержат дендритные клетки костного мозга; улучшение памяти; и уменьшение когнитивного дефицита. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению улучшают память и/или уменьшают когнитивный дефицит при введении индивиду.

#### *Фосфорилирование Syk*

[0124] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут индуцировать фосфорилирование тирозинкиназы селезенки (Syk) после связывания с белком TREM2, экспрессируемым в клетке.

[0125] Тирозинкиназа селезенки (Syk) представляет собой внутриклеточную сигнальную молекулу, которая функционирует после TREM2 путем фосфорилирования нескольких субстратов, тем самым способствуя образованию сигнального комплекса, ведущего к клеточной активации и воспалительным процессам.

[0126] В некоторых вариантах осуществления способность агонистических антител к TREM2 индуцировать активацию Syk определяют путем культивирования мышинных макрофагов и измерения состояния фосфорилирования белка Syk в клеточных экстрактах. В некоторых вариантах осуществления макрофаги костного мозга (BMDM) от мышей дикого типа (ДТ), от мышей с нокаутом TREM2 (KO) и от мышей, у которых отсутствует экспрессия гена общей гамма-цепи функционального Fc-рецептора (FcγR KO; ссылка: Takai T 1994. Cell 76(3):519-29), выдерживают в течение 4 часов в RPMI с 1% сывороткой, а затем удаляют из чашек для культур тканей с PBS-EDTA, промывают PBS и подсчитывают. В некоторых вариантах осуществления клетки покрывают полноразмерными антителами к TREM2 или контрольными антителами в течение 15 минут на льду. В некоторых вариантах осуществления после промывания холодным PBS клетки инкубируют при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. В некоторых вариантах осуществления после стимуляции клетки лизируют буфером для лизиса (1% об./об. NP-40%, 50 mM Трис-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерина с ингибиторами протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых веществ. В некоторых вариантах осуществления лизаты затем подвергают иммунопреципитации антителом к Syk (N-19 для BMDM или 4D10 для ДК человека, Santa Cruz Biotechnology). В некоторых вариантах осуществления осажденные белки фракционируют с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, переносят на мембраны PVDF и исследуют с помощью антитела против фосфотирозина (4G10, Millipore). В некоторых вариантах осуществления для подтверждения того, что все субстраты надлежащим образом иммунопреципитированы, иммуноблоты повторно исследуют с антителом против Syk (Abcam, для BMDM) или против Syk (Novus Biological, для ДК человека). В некоторых вариантах осуществления визуализацию выполняют с помощью системы усиления хемиллюминесценции (ECL) (GE

Healthcare), как описано (например, в Peng et al., (2010) Sci Signal., 3(122): ra38).

### *Связывание и фосфорилирование DAP12*

[0127] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут индуцировать связывание TREM2 с DAP12. В других вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут индуцировать фосфорилирование DAP12 после связывания с белком TREM2, экспрессированным в клетке. В других вариантах осуществления опосредованное TREM2 фосфорилирование DAP12 индуцируется одной или более тирозинкиназами семейства SRC. Примеры тирозинкиназ семейства Src включают, без ограничения, Src, Syk, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn, и Frk.

[0128] DAP12 по-разному называют белком, связывающим протеинтирозинкиназу TYRO, TYROBP, KARAP и PLOSL. DAP12 представляет собой трансмембранный сигнальный белок, который содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 может индуцировать фосфорилирование DAP12 в его мотиве ITAM. Можно использовать любой известный в данной области техники способ определения фосфорилирования белка, такой как фосфорилирование DAP12.

[0129] В некоторых вариантах осуществления DAP12 фосфорилируется киназами семейства SRC, что приводит к рекрутированию и активации киназы Syk, киназы ZAP70 или обеих в комплекс DAP12/TREM2.

[0130] В некоторых вариантах осуществления способность антител к TREM2 индуцировать активацию DAP12 определяют путем культивирования мышинных макрофагов и измерения состояния фосфорилирования белка DAP12 в клеточных экстрактах. В некоторых вариантах осуществления перед стимуляцией антителами мышинные макрофаги костного мозга дикого типа (ДТ) (BMDM) и нокаутные по TREM2 (КО) BMDM истощают в течение 4 ч в RPMI с 1% сывороткой. В некоторых вариантах осуществления  $15 \times 10^6$  клеток инкубируют на льду в течение 15 мин с полноразмерными антителами к TREM2 или контрольными антителами. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают и инкубируют при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. В некоторых вариантах осуществления после стимуляции клетки лизируют буфером для лизиса (1% об./об. н-додecil-β-D-мальтозид, 50 mM трис-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерин, плюс ингибиторы протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. В некоторых вариантах осуществления клеточный лизат подвергают иммунопреципитации вторым антителом к TREM2 (R&D Systems). В некоторых вариантах осуществления осажденные белки фракционируют с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, переносят на мембраны PVDF и исследуют с помощью антител к фосфотирозину (4G10, Millipore). В некоторых вариантах осуществления мембрану удаляют и повторно исследуют с помощью антитела к DAP12 (Cells Signaling, D7G1X). В

некоторых вариантах осуществления каждый клеточный лизат, используемый для иммунопреципитации TREM2, содержит равное количество белков, на что указывает контрольное антитело (анти-актин, Santa Cruz).

*Пролиферация, выживание и функциональность клеток, экспрессирующих TREM2*

[0131] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут повышать пролиферацию, выживаемость и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и микроглиальных клеток (микроглии) после связывания с белком TREM2, экспрессируемым в клетке. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению не ингибируют рост (например, пролиферацию и/или выживаемость) одной или более клеток врожденного иммунитета.

[0132] Микроглиальные клетки представляют собой тип глиальных клеток, которые являются резидентными макрофагами головного и спинного мозга и, таким образом, действуют как первая и основная форма активной иммунной защиты в центральной нервной системе (ЦНС). Микроглиальные клетки составляют 20% от общей популяции глиальных клеток головного мозга. Микроглиальные клетки постоянно очищают ЦНС от бляшек, поврежденных нейронов и инфекционных агентов. Головной и спинной мозг считаются «иммунопривилегированными» органами, поскольку они отделены от остального тела рядом эндотелиальных клеток, известных как гематоэнцефалический барьер, который предотвращает попадание большинства инфекций в уязвимую нервную ткань. В случае, когда инфекционные агенты попадают непосредственно в мозг или пересекают гематоэнцефалический барьер, микроглиальные клетки должны быстро реагировать, чтобы уменьшить воспаление и уничтожить инфекционные агенты, прежде чем они повредят чувствительную нервную ткань. Из-за недоступности антител из остальной части тела (немногие антитела достаточно малы, чтобы преодолеть гематоэнцефалический барьер), микроглия должна быть способна распознавать инородные тела, поглощать их и действовать как антигенпрезентирующие клетки, активирующие Т-клетки. Поскольку этот процесс должен быть выполнен быстро, чтобы предотвратить потенциально фатальные повреждения, микроглиальные клетки чрезвычайно чувствительны даже к небольшим патологическим изменениям в ЦНС. Они достигают такой чувствительности отчасти за счет наличия уникальных калиевых каналов, которые реагируют даже на небольшие изменения внеклеточного калия.

[0133] В контексте данного документа макрофаги по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, макрофаги M1, активированные макрофаги M1 и макрофаги M2. В контексте данного документа клетки микроглии по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, микроглиальные клетки M1, активированные микроглиальные клетки M1 и микроглиальные клетки M2.

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут повышать экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, моноцитах и/или макрофагах.

[0135] В контексте данного документе скорость пролиферации, выживаемость и/или функция макрофагов, дендритных клеток, моноцитов и/или микроглии может включать повышенную экспрессию, если скорость пролиферации, частота выживаемости и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокласты, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии у субъекта, получавшего лечение антителом к TREM2 по настоящему изобретению, выше, чем скорость пролиферации, выживаемость и/или функция дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии у соответствующего субъекта, которого не лечили антителом к TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 по настоящему изобретению может повышать скорость пролиферации, выживаемость и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, 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%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 115%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 135%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 145%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 160%, по меньшей мере 170%, по меньшей мере 180%, по меньшей мере 190% или по меньшей мере 200%, например, по сравнению со скоростью пролиферации, выживаемостью и/или функцией дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии у соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2. В других вариантах осуществления антитело к TREM2 по настоящему изобретению может повышать скорость пролиферации, выживаемость и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии в по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 1,6 раза, по меньшей мере 1,7 раза, по меньшей мере 1,8 раза, по меньшей мере 1,9 раза, по меньшей мере 2,0 раза, по меньшей мере 2,1 раза, по меньшей мере 2,15 раза, по меньшей мере 2,2 раза, по меньшей мере 2,25 раза по меньшей мере 2,3 раза, по меньшей мере 2,35 раза, по меньшей мере 2,4 раза, по меньшей мере 2,45 раза, по меньшей мере 2,5 раза, по меньшей мере 2,55 раза, по меньшей мере 3,0 раза, по меньшей мере 3,5 раза, по меньшей мере 4,0 раза, по меньшей мере 4,5 раза, по меньшей мере 5,0 раз, по меньшей мере 5,5 раза, по меньшей мере 6,0 раз, по меньшей мере 6,5 раза, по меньшей мере 7,0 раз, по меньшей мере 7,5 раза, по меньшей мере 8,0 раз, по меньшей мере 8,5 раза, по меньшей мере 9,0 раз, по меньшей мере 9,5 раза или по меньшей мере в 10 раз, например, по сравнению со скоростью пролиферации, выживаемостью и/или функцией дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и/или микроглии у соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к

## TREM2.

[0136] В некоторых вариантах осуществления для оценки способности антител к TREM2 индуцировать или повышать выживаемость клеток *in vitro* макрофаги с дефицитом субъединицы гамма-цепи рецепторов FcγRI, FcγRIII и FcεRI (мыши FcγRIKO, REF: Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch J. (1994). Cell, 76:519-529) культивируют в присутствии связанных с планшетом антител к TREM2, а жизнеспособность клеток определяют, когда клетки культивируют в субоптимальных условиях роста. В некоторых вариантах осуществления мышинные клетки-предшественники костного мозга от мышей FcγRI KO (Taconic, модель 584) получают путем промывания клеток мозга большеберцовой и бедренной костей холодным PBS. В некоторых вариантах осуществления после одной промывки PBS эритроциты лизируют с использованием буфера для лизиса ACK (Lonza), дважды промывают PBS и суспендируют в концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в полной среде RPMI (10% FCS, Pen/Strep, Gln, neAA) с указанным количеством M-CSF (Peprotech) для получения макрофагов. В некоторых вариантах осуществления для анализа жизнеспособности костномозговых макрофагов клетки получают, как указано выше, и высевают в количестве  $2,5 \times 10^4/200$  μл на 96-луночный планшет с субоптимальными количествами M-CSF (10 нг/мл) в планшетах, необработанных культурой ткани, в течение двух дней. В некоторых вариантах осуществления клетки затем количественно определяют с использованием набора ToxGlo™ (Promega) и определяют люминесценцию как показатель жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления все эксперименты проводят в присутствии или в отсутствие антител к TREM2 или антител изотипического контроля.

*TREM2-зависимая экспрессия генов*

[0137] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут повышать активность и/или экспрессию TREM2-зависимых генов, таких как один или более факторов транскрипции семейства факторов транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT).

[0138] В некоторых вариантах осуществления способность растворимых полноразмерных антител к TREM2 активировать мышинные или человеческие TREM2-зависимые гены оценивают с использованием репортерного гена люциферазы под контролем промотора NFAT (ядерного фактора активированных Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления линия клеток BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™), полученная из Т-лимфоцитов мышинной лимфомы тимуса, инфицирована мышинными TREM2 и DAP12 и вирусом Signal Lenti NFAT-Luciferase (Qiagen). В некоторых вариантах осуществления альтернативно линия клеток BW5147.G.1.4 инфицирована человеческим слитым белком TREM2/DAP12 и вирусом Signal Lenti NFAT-Luciferase (Qiagen). В некоторых вариантах осуществления в качестве положительного контроля для сигналинга вместе добавляют РМА (0,05 мкг/мл) и иономицин (0,25 мкМ). В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют вместе с растворимыми антителами к TREM2 и антителами изотипического контроля в течение 6 часов и измеряют активность люциферазы путем

добавления реагента OneGlo (Promega) в каждую лунку и инкубации в течение 3 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов. В некоторых вариантах осуществления сигнал люциферазы измеряют с помощью планшет-ридера BioTek. В некоторых вариантах осуществления клетки демонстрируют тонический TREM2-зависимый сигналинг либо из-за присутствия эндогенного лиганда, либо из-за спонтанной агрегации рецепторов, что приводит к сигналингу TREM2.

[0139] В некоторых вариантах осуществления усиление одной или более активностей TREM2, индуцированное связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2, измеряют, например, с использованием клеточного анализа *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления увеличение одной или более активностей TREM2 можно измерить с помощью любого подходящего клеточного анализа *in vitro* или подходящей модели *in vivo*, описанной в данном документе или известной в данной области техники, например, с использованием репортерного анализа на основе люциферазы для измерения экспрессии генов, зависимой от TREM2, с использованием вестерн-блоттинга для измерения увеличения TREM2-индуцированного фосфорилирования партнеров по нисходящему сигналингу, таких как Syk, или с использованием проточной цитометрии, такой как сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), для измерения изменения уровня маркеров активации TREM2 на клеточной поверхности. Для измерения взаимодействия (например, связывания) между TREM2 и одним или более лигандами TREM2 можно использовать любые анализы на клеточной основе *in vitro* или подходящую модель *in vivo*, описанную в данном документе или известную в данной области техники.

[0140] В некоторых вариантах осуществления увеличение одной или более активностей TREM2 измеряют с помощью клеточного анализа *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления для оценки способности антител к TREM2 повышать выживаемость клеток *in vitro* макрофаги с дефицитом субъединицы гамма-цепи рецепторов FcγRI, FcγRIII и FcεRI (мыши Fcγr1KO, REF: Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch J. (1994). Cell, 76:519-529) культивируют в присутствии связанных с планшетом антител к TREM2, а жизнеспособность клеток определяют, когда клетки культивируют в субоптимальных условиях роста. В некоторых вариантах осуществления мышинные клетки-предшественники костного мозга от мышей Fcγr1 KO (Taconic, модель 584) получают путем промывания клеток мозга большеберцовой и бедренной костей холодным PBS. В некоторых вариантах осуществления после одной промывки PBS эритроциты лизируют с использованием буфера для лизиса ACK (Lonza), дважды промывают PBS и суспендируют в концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в полной среде RPMI (10% FCS, Pen/Strep, Gln, neAA) с указанным количеством M-CSF (Peprotech) для получения макрофагов. В некоторых вариантах осуществления для анализа жизнеспособности костномозговых макрофагов клетки получают, как указано выше, и высевают в количестве  $2,5 \times 10^4/200$  μл на 96-луночный планшет с субоптимальными количествами M-CSF (10 нг/мл) в планшетах, необработанных культурой ткани, в течение



двух дней. В некоторых вариантах осуществления клетки затем количественно определяют с использованием набора ToxGlo™ (Promega) и определяют люминесценцию как показатель жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах осуществления все эксперименты проводят в присутствии или в отсутствие антител к TREM2 или антител изотипического контроля.

[0141] В некоторых вариантах осуществления увеличение одной или более активностей TREM2 измеряют с помощью клеточного анализа *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления для оценки способности антител к TREM2 увеличивать количество иммунных клеток *in vivo* мышам C57Bl6 внутрибрюшинно (в/б) инъецируют антитело к TREM2 или мышинное антитело IgG1 изотипического контроля, а количество иммунных клеток в головном мозге определяют количественно с помощью FACS. В некоторых вариантах осуществления от трех до четырех мышей в группе получают внутрибрюшинную инъекцию 40 мг/кг антитела к TREM2 или антитела mIgG1 изотипического контроля (клон MOPC-21, Bioxcell). В некоторых вариантах осуществления через 48 часов весь головной мозг собирают, промывают PBS, инкубируют при 37°C в PBS, содержащем 1 мг/мл коллагеназы, и обрабатывают через клеточное сито для получения суспензии отдельных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки затем инкубируют с анти-CD45-PerCp-Cy7, анти-CD11b-PerCP-Cy5.5, анти-Gr1-FITC антителами и красителем для оценки жизнеспособности клеток (Life Technologies, кат. № L34957) в течение 30 минут на льду, затем дважды промывали холодным буфером для FACS. В некоторых вариантах осуществления образцы, фиксированные 4% PFA, затем анализируют с помощью FACS. В некоторых вариантах осуществления данные получают на цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) и анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo.

[0142] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 по настоящему изобретению усиливает одну или более активностей TREM2, индуцированных связыванием лиганда TREM2 с белком TREM2, если оно индуцирует увеличение в диапазоне от около 1,5 до около 6 раз или более, или более чем в 6 раз индуцированной лигандом TREM2-зависимой транскрипции генов при использовании в концентрации от около 0,5 нМ до около 50 нМ, или более 50 нМ, и по сравнению с уровнем TREM2-зависимой транскрипции генов, индуцированной связыванием лиганда TREM2 с белком TREM2 в отсутствие антитела к TREM2, когда лиганд TREM2 используется в его концентрации EC<sub>50</sub>. В некоторых вариантах осуществления увеличение индуцированной лигандом TREM2-зависимой транскрипции гена составляет в по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 11 раз, по меньшей мере 12 раз, по меньшей мере 13 раз, по меньшей мере 14 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 16 раз, по меньшей мере 17 раз, по меньшей мере 18 раз, по меньшей мере 19 раз, по меньшей мере 20 раз или более при использовании в

концентрации от около 0,5 нМ до около 50 нМ или выше 50 нМ, и по сравнению с уровнем TREM2-зависимой транскрипции гена, индуцированной связыванием лиганда TREM2 с белком TREM2 в отсутствие антитела к TREM2, когда лиганд TREM2 используется в концентрации  $EC_{50}$ .

[0143] В некоторых вариантах осуществления антитело против TREM2 используется в концентрации по меньшей мере 0,5 нМ, по меньшей мере 0,6 нМ, по меньшей мере 0,7 нМ, по меньшей мере 0,8 нМ, по меньшей мере 0,9 нМ, по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 3 нМ, по меньшей мере 4 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 6 нМ, по меньшей мере 7 нМ, по меньшей мере 8 нМ, по меньшей мере 9 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 15 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 25 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 35 нМ, по меньшей мере 40 нМ, по меньшей мере 45 нМ, по меньшей мере 46 нМ, по меньшей мере 47 нМ, по меньшей мере 48 нМ, по меньшей мере 49 нМ или по меньшей мере 50 нМ. В некоторых вариантах осуществления лиганд TREM2 представляет собой фосфатидилсерин (PS). В некоторых вариантах осуществления лиганд TREM2 представляет собой сфингомиелин (SM). В некоторых вариантах осуществления увеличение еще одной активности TREM2 можно измерить с помощью любого подходящего клеточного анализа *in vitro* или подходящей модели *in vivo*, описанной в данном документе или известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления репортерный анализ на основе люциферазы используется для измерения кратного увеличения индуцированной лигандом TREM2-зависимой экспрессии гена в присутствии и в отсутствие антитела, как описано, например, в WO2017/062672 и WO2019/028292.

[0144] В данном контексте антитело к TREM2 по настоящему изобретению не конкурирует, не ингибирует или иным образом блокирует взаимодействие (например, связывание) между одним или более лигандами TREM2 и TREM2, если оно снижает связывание лиганда с TREM2 менее чем на 20% при насыщающих концентрациях антител с использованием любого анализа *in vitro* или анализа на основе культуры клеток, описанного в данном документе или известного в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению ингибируют взаимодействие (например, связывание) между одним или более лигандами TREM2 и TREM2 менее чем на 20%, менее чем на 19%, менее чем на 18%, менее чем на 17%, менее чем на 16%, менее чем на 15%, менее чем на 14%, менее чем на 13%, менее чем на 12%, менее чем на 11%, менее чем на 10%, менее чем на 9%, менее чем на 8%, менее чем на 7%, менее чем на 6%, менее чем на 5%, менее чем на 4%, менее чем на 3%, менее чем на 2% или менее чем на 1% при насыщающих концентрациях антител с использованием любого описанного анализа *in vitro* или анализа на основе культуры клеток, описанного в данном документе или известного в данной области техники.

#### **Антитела к TREM2, которые снижают растворимый TREM2**

[0145] В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2

снижает уровень растворимого TREM2 (sTREM2). В некоторых вариантах реализации агонистическое антитело к TREM2 снижает уровень sTREM2, который «слушивается» с клеточной поверхности во внеклеточный образец (например, шеддинг). В некоторых вариантах осуществления такое антитело связывается с областью TREM2 таким образом, что оно блокирует расщепление TREM2. В таких вариантах осуществления антитело связывается с областью, содержащей His157, сайтом расщепления TREM2.

[0146] Степень ингибирования расщепления TREM2 антителом к TREM2 отрицательно коррелирует с количеством растворимого TREM2 (sTREM2) в присутствии антитела к TREM2 по сравнению с количеством sTREM2 в отсутствие антитела к TREM2. Например, антитело к TREM2 можно рассматривать как антитело к TREM2, которое ингибирует расщепление TREM2, если в присутствии указанного антитела к TREM2 количество sTREM2 составляет 0-90%, предпочтительно 0-80%, более предпочтительно 0-70%, еще более предпочтительно 0-60%, еще более предпочтительно 0-50% и еще более предпочтительно 0-20% количества sTREM2 в отсутствие антитела к TREM2, как определено, например, с помощью количественную оценку sTREM2 на основе ИФА.

[0147] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 снижает уровень 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 реализации антитело к TREM2 снижает уровни sTREM2, если количество sTREM2 в обработанном образце уменьшается по меньшей мере в 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 реализации контрольное значение представляет собой количество sTREM2 в необработанном образце (например, супернатант из экспрессирующей TREM2 клетки, не обработанной антителом к TREM2, или образец от субъекта, не обработанный антителом к TREM2) или образце, обработанном соответствующим антителом, не связывающим TREM2.

[0148] В некоторых вариантах осуществления выделение sTREM2 измеряют с использованием образца, который содержит жидкость, например, кровь, плазму, сыворотку, мочу или спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец содержит спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец содержит супернатант клеточных культур (например, супернатант первичной клетки или линии клеток, которые эндогенно экспрессируют TREM2, таких как макрофаги человека, или первичные клетки или линии клеток, которые были сконструированы для экспрессии TREM2).

[0149] В некоторых вариантах осуществления уровень sTREM2 в образце измеряют с помощью иммунологического анализа. Иммуноанализы известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, иммуноферментные анализы (EIA), такие как анализ с ферментативным усилением (EMIA), твердофазный

иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноферментный анализ на микрочастицах (MEIA), иммуногистохимию (ИНС), иммуноцитохимию, иммуноанализы с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммуноанализы (RIA), иммунофлуоресценцию, иммунохемилюминесцентные анализы (CL) и электрохемилюминесцентные иммуноанализы (ECL). В некоторых вариантах осуществления уровни sTREM2 измеряют с помощью анализа ИФА.

[0150] В некоторых вариантах осуществления анализ ИФА можно использовать для количественного определения уровней sTREM2 в супернатантах культур клеток. В некоторых вариантах осуществления ИФА для sTREM2 человека проводят с использованием сканера Meso Scale Discovery SECTOR Imager 2400. В некоторых вариантах осуществления покрытые стрептавидином 96-луночные планшеты блокируют в течение ночи при 4°C в 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,05% Tween 20 в PBS (pH 7,4) (блокирующий буфер). В некоторых вариантах осуществления планшеты встряхивают в течение 1 часа при комнатной температуре с биотинилированным поликлональным козьим захватывающим антителом к TREM2 человека (0,25 мг/мл; R&D Systems), разведенным в блокирующем буфере. В некоторых вариантах осуществления планшеты последовательно промывают четыре раза 0,05% Tween 20 в PBS (промывочный буфер) и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре с образцами, разведенными 1:4 в 0,25% BSA и 0,05% Tween 20 в PBS (pH 7,4). (буфер для анализа), дополненный ингибиторами протеазы (Sigma). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный белок TREM2 человека (Holzel Diagnostika) разбавляют в буфере для анализа в двукратном серийном разведении и используют для стандартной кривой (диапазон концентраций от 4000 до 62,5 пг/мл). В некоторых вариантах осуществления планшеты промывают три раза в течение 5 минут промывочным буфером перед инкубацией в течение 1 часа при комнатной температуре с мышинным моноклональным антителом к TREM2 (1 мг/мл; Santa Cruz Biotechnology; B-3), разведенным в блокирующем буфере. В некоторых вариантах осуществления после трех дополнительных стадий промывки планшеты инкубируют с меченым SULFO-TAG антимишиным вторичным антителом (1:1000; Meso Scale Discovery) и инкубируют в течение 1 часа в темноте. В некоторых вариантах осуществления планшеты трижды промывают промывочным буфером с последующими двумя стадиями промывки в PBS и проявляют путем добавления буфера для считывания Meso Scale Discovery Read. В некоторых вариантах осуществления световое излучение при 620 нм после электрохимической стимуляции измеряют с помощью считывающего устройства Meso Scale Discovery SECTOR Imager 2400. В некоторых вариантах осуществления для количественного определения уровней секретлируемого sTREM2 кондиционированные среды из биологических повторов анализируют в двух повторностях. В некоторых вариантах осуществления стандартные кривые sTREM2 генерируют с использованием программного обеспечения MasterPlex ReaderFit (MiraiBio Group, Hitachi Solutions America) посредством пятипараметрической логистической аппроксимации. В некоторых вариантах

осуществления уровни sTREM2 впоследствии нормализуют к уровням незрелого TREM2, что определяется количественно с помощью вестерн-блоттинга.

[0151] В некоторых вариантах осуществления sTREM2 может представлять собой неактивные варианты клеточных рецепторов TREM2. В некоторых вариантах осуществления sTREM2 может присутствовать на периферии, например, в плазме или головном мозге субъекта, и может секвестрирует антитела к TREM2. Такие секвестрированные антитела не смогут связываться и активировать, например, клеточный рецептор TREM2, присутствующий в клетках. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению, такие как агонистические антитела к TREM2 по настоящему изобретению, не связываются с растворимым TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению, такие как агонистические антитела к TREM2 по настоящему изобретению, не связываются с растворимым TREM2 *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 по настоящему изобретению, которые не связываются с растворимым TREM2, могут связываться с эпитопом на TREM2, который, например, может включать часть внеклеточного домена клеточного TREM2, не содержащегося в sTREM2, например, один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных остатков 161-175; может находиться в трансмембранной части TREM2 или рядом с ней; или может включать трансмембранную часть TREM2.

#### **Антитела, которые влияют на кластеризацию TREM2**

[0152] *In vivo* антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут активировать рецепторы с помощью множества потенциальных механизмов. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 по настоящему изобретению благодаря соответствующей эпитопной специфичности обладают способностью активировать TREM2 в растворе без необходимости кластеризации со вторичным антителом, связывания на планшетах или кластеризации через Fcγ-рецепторы. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению имеют изоформы человеческих антител, такие как IgG2, которые благодаря своей уникальной структуре обладают присущей им способностью объединять рецепторы в кластеры или сохранять рецепторы в кластерной конфигурации, тем самым активируя рецепторы, такие как TREM2 без связывания с Fc-рецептором (например, , White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148).

[0153] В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 могут индуцировать или поддерживать кластеризацию на клеточной поверхности, чтобы активировать TREM2 и передавать сигнал. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 с соответствующей эпитопной специфичностью могут индуцировать или поддерживать кластеризацию TREM2 на клеточной поверхности и/или активировать TREM2. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 124-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2,

соответствующих аминокислотным остаткам 124-153 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 129-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 129-153 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 140-149 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-149 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 149-157 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 149-157 SEQ ID NO: 1; или в пределах аминокислотных остатков 153-162 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 153-162 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела к TREM2 связываются с одним или более аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1, или одним или более аминокислотными остатками в белке TREM2 млекопитающих, соответствующих аминокислотному остатку, выбранному из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156, и H157 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению кластеризуют рецепторы (например, TREM2) путем связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами на соседних клетках. Связывание константной части Fc IgG антитела с Fc $\gamma$ -рецепторами приводит к агрегации антител, а антитела, в свою очередь, агрегируют рецепторы, с которыми они связываются через свою вариабельную область (Chu et al (2008) *Mol Immunol* , 45:3926-3933; и Wilson et al., (2011) *Cancer Cell* 19, 101-113). Любой подходящий анализ, известный специалисту в данной области техники (например, описанный в WO 2017/062672 и WO 2019/028292), можно использовать для определения кластеризации антител.

[0154] Другие механизмы также могут быть использованы для кластеризации рецепторов (например, TREM2). Например, в некоторых вариантах осуществления фрагменты антител (например, фрагменты Fab), которые сшиты друг с другом, можно использовать для кластеризации рецепторов (например, TREM2) способом, подобным антителам с областями Fc, которые связывают Fc $\gamma$ -рецепторы, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления поперечно-сшитые фрагменты антител (например, фрагменты Fab) могут функционировать как агонистические антитела, если они индуцируют кластеризацию рецепторов на поверхности клетки и связывают соответствующий эпитоп на мишени (например, TREM2).

[0155] Антитело, зависимое от связывания с Fc $\gamma$ R-рецептором для активации рецепторов-мишеней, может потерять свою агонистическую активность, если оно сконструировано для устранения связывания Fc $\gamma$ R (см., например, Wilson et al., (2011) *Cancer Cell* 19, 101-113; Armour et al., (2003) *Immunology* 40 (2003) 585-593); и White et al., (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148). Таким образом, считается, что антитело к TREM2 по настоящему изобретению с соответствующей эпитопной специфичностью может активировать TREM2, когда антитело имеет домен Fc.

[0156] Иллюстративные изотипы и модификации Fc антител представлены в

таблице В ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип Fc, указанный в таблице А ниже.

**Таблица А: Иллюстративные изотипы Fc антитела, которые способны связываться с Fc-гамма-рецептором**

Изотип Fc	Мутация (схема нумерации EU)
IgG1	N297A
IgG1	D265A и N297A
IgG1	D270A
IgG1	L234A и L235A L234A и G237A L234A и L235A, и G237A
IgG1	P238D и/или L328E, и/или S267E/L328F, и/или E233, и/или G237D, и/или H268D, и/или P271G, и/или A330R
IgG1	P238D и L328E, и E233D, и G237D, и H268D, и P271G, и A330R
IgG1	P238D и L328E, и G237D, и H268D, и P271G, и A330R
IgG1	P238D и S267E, и L328F, и E233D, и G237D, и H268D, и P271G, и A330R
IgG1	P238D и S267E, и L328F, и G237D, и H268D, и P271G, и A330R
IgG2	V234A и G237A
IgG4	L235A, и G237A, и E318A
IgG4	S228P и L236E
Гибрид IgG2/4	AK 118-260 IgG2 и AK 261-447 IgG4
	H268Q и V309L; и A330S и P331S
IgG1	C226S и C229S, и E233P, и L234V, и L235A
IgG1	L234F и L235E, и P331S
IgG2	C232S или C233S
IgG2	A330S и P331S
IgG1	S267E, и L328F Только S267E
IgG2	S267E и L328F
IgG4	S267E и L328F
IgG2	НС ДТ с каппа LC (легкой цепью) НС C127S с каппа LC

	Каппа LC C214S Каппа LC C214S и HC C233S Каппа LC C214S и HC C232S Любая из перечисленных выше мутаций вместе с мутациями A330S и P331S Фрагмент F(ab') <sub>2</sub> IgG1 дикого типа и любая из перечисленных выше мутаций
IgG1	Замените константную тяжелую 1 (CH1) и шарнирную область IgG1 на CH1 и шарнирную область IgG2. ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYLSLVVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS NTKVDKTVR KCCVECPCP (SEQ ID NO: 42) С каппа LC
IgG1	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с A330L/A330S и/или L234F, и/или L235E, и/или P331S
IgG1, IgG2, или IgG4	Любая из вышеперечисленных мутаций вместе с M252Y и/или S254T, и/или T256E
Мышиный IgG1	Для мышиных моделей болезней
IgG4	ДТ
IgG1	Любая из перечисленных выше мутаций вместе с E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W и/или любой их комбинацией.
IgG2	Любая из перечисленных выше мутаций вместе с E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W и/или любой их комбинацией.

[0157] В некоторых вариантах осуществления антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0158] Антитела с изотипами IgG1 или IgG3 человека и их мутантами (например, Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:685-691), которые связывают активирующие Fcγ-рецепторы I, IIА, IIС, IIIА, IIIВ у человека и/или Fcγ-рецепторы I, III и IV у мыши, также могут действовать как агонистические антитела *in vivo*, но могут быть связаны с эффектами, связанными с ADCC. Однако такие Fcγ-рецепторы, по-видимому, менее доступны для связывания антител *in vivo* по сравнению с ингибиторным Fcγ-рецептором FcγRIIB (см., например, White, et al., (2013) Cancer Immunol. Immunother. 62,



941-948; и Li et al., (2011) Science 333(6045):1030-1034.).

[0159] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG2 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует одну или несколько активностей TREM2, активности DAP12 или обе активности независимо от связывания с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγIIВ), который сводит к минимуму или устраняет ADCC. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с областью Fc дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен выбраны из V234A (Alegre et al., (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) Cell Immunol, 200:16-26), G237A (Cole et al. (1999) Transplantation, 68:563-571), H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. (1999) Eur J Immunol 29: 2613-2624; Armour et al. (2000) The Haematology Journal 1(Suppl.1):27; Armour et al. (2000) The Haematology Journal 1(Suppl.1):27), C232S, и/или C233S (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148), S267E, L328F (Chu et al., (2008) Mol Immunol, 45:3926-3933), M252Y, S254T, и/или T256E, где аминокислотное положение соответствует системе нумерации EU.

[0160] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом тяжелой цепи, который содержит аминокислотную замену C127S, где положение аминокислот соответствует системе нумерации EU (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148; Lightle et al., (2010) PROTEIN SCIENCE 19:753-762; и WO2008079246).

[0161] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом легкой каппа-цепи, который содержит аминокислотную замену C214S, где положение аминокислот соответствует системе нумерации EU (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148; Lightle et al., (2010) PROTEIN SCIENCE 19:753-762; и WO2008079246).

[0162] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область мышинового IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах осуществления ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий рецептор Fc-гамма IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления область Fc содержит

одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с областью Fc дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен выбраны из N297A (Bolt S et al. (1993) Eur J Immunol 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) R. J. Biol. Chem. 276, 6591-6604), L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) Cell Immunol, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) Cell Immunol, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) Blood, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, и/или T256E, где положение аминокислот соответствует системе нумерации EU.

[0163] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен 1 (CH1) тяжелой цепи и шарнирную область изотипа IgG2 (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148). В некоторых вариантах осуществления CH1 и шарнирная область изотип IgG2 содержат аминокислотную последовательность ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHMKPSNTKVKDKTVERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, где аминокислотное положение соответствует системе нумерации EU.

[0164] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах осуществления ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий рецептор Fc-гамма IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с областью Fc дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен выбраны из L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000) J Immunol, 164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, и/или T256E, где аминокислотное положение соответствует системе нумерации EU.

[0165] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет гибридный изотип IgG2/4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 в соответствии с нумерацией EU IgG2 человека и аминокислоты 261-447 в соответствии с нумерацией EU IgG4 человека (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

[0166] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную

область мышинового IgG4 (Bartholomaeus, et al. (2014). J. Immunol. 192, 2091-2098).

[0167] В некоторых вариантах осуществления область Fc дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен, выбранных из A330L, L234F; L235E или P331S согласно нумерации EU; и любую их комбинацию.

[0168] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит одну или более аминокислотных замен в области Fc в положении остатка, выбранном из C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любой их комбинации, причем нумерация остатков соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, L243A, L235A, и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G и K322A, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, A330S, и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, A330S, и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, и A330S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, и P331S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях S267E и L328F, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положении C127S, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотную замену в положениях E345R, E430G и S440Y, где нумерация положения остатка соответствует нумерации EU.

[0169] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG1 человека и содержит аминокислотные замены в области Fc в положениях остатков P331S и E430G, где нумерация остатков соответствует нумерации EU. Область Fc, содержащая аминокислотные замены в положениях остатков P331S и E430G, может обозначаться как «PSEG».

#### *Дополнительные мутации IgG*

[0170] В некоторых вариантах осуществления один или более вариантов IgG1, описанных в данном документе, могут быть объединены с мутацией A330L (Lazar et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 103:4005-4010), или одной или более из мутаций L234F, L235E и/или P331S (Sazinsky et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105:20167-20172), где

аминокислотное положение соответствует системе нумерации EU, для устранения активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления варианты IgG, описанные в данном документе, могут быть объединены с одной или более мутациями для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке человека (например, мутации M252Y, S254T, T256E в соответствии с системой нумерации EU) (Dall'Acqua et al., (2006) J Biol Chem, 281:23514-23524; и Strohl et al., (2009) Current Opinion in Biotechnology, 20:685-691).

[0171] В некоторых вариантах осуществления вариант IgG4 по данному изобретению может быть объединен с мутацией S228P в соответствии с системой нумерации EU (Angal et al., (1993) Mol Immunol, 30:105-108) и/или с одной или более мутациями, раскрытыми в Peters et al., (2012) J Biol Chem. 13;287(29):24525-33) для усиления стабилизации антител.

#### *Иллюстративные антитела к TREM2*

[0172] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 по настоящему изобретению связывается с TREM2 с высокой аффинностью, является агонистом и индуцирует одну или более активностей TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает одну или более активностей TREM2, индуцированных связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2, по сравнению с одной или более активностями TREM2, индуцированными связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2 в отсутствие выделенного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 усиливает одну или более активностей TREM2, не конкурируя или иным образом не блокируя связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело, биспецифическое антитело, поливалентное антитело или химерное антитело. Иллюстративные описания таких антител можно найти по всему данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

[0173] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению связываются с человеческим TREM2 или его гомологом, включая, помимо прочего, белок TREM2 млекопитающего (например, отличного от человека млекопитающего), белок TREM2 мыши (номер доступа в базе данных Uniprot Q99NH8), белок TREM2 крысы (номер доступа в базе данных Uniprot D3ZZ89), белок TREM2 макаки-резуса (номер доступа в базе данных Uniprot F6QVF2), белок TREM2 яванского макака (номер доступа в базе данных NCBI XP\_015304909.1), белок TREM2 лошади (номер доступа в базе данных Uniprot F7D6L0), белок TREM2 свиньи (номер доступа в базе данных Uniprot H2EZZ3) и белок TREM2 собаки (номер доступа в базе данных Uniprot E2RP46). В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению специфически связываются с TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению специфически

связываются с TREM2 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению специфически связываются как с TREM2 человека, так и с TREM2 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению индуцируют по меньшей мере одну активность TREM2 по настоящему изобретению.

***Области связывания антител к TREM2***

[0174] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 124-153 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 124-153 SEQ ID NO: 1; одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 129-153 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 129-153 SEQ ID NO: 1; одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 140-149 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-149 SEQ ID NO: 1; одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 149-157 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 149-157 из SEQ ID NO: 1; или одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 153-162 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 153-162 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению связывают один или более из аминокислотных остатков D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1, или один или более аминокислотных остатков в белке TREM2 млекопитающего, соответствующих аминокислотному остатку, выбранному из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1.

***Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела к TREM2***

[0175] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2, которые следует использовать в способах по настоящему изобретению, описаны в WO 2019/028292, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2, используемые в способах по настоящему изобретению, индуцируют или усиливают одну или более из следующих активностей TREM2: связывание TREM2 с DAP12; фосфорилирование DAP12; активация киназы Syk; модулирование одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , YM-1, IL-6, IL-8, CRP, CD86, MCP-1/CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CXCL-10, Gata3, Rorc, члены семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, GM-CSF, CSF-1, MHC-II, OPN, CD11c, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 и IL-23, необязательно, при этом модуляция происходит в одной или более клетках, выбранных из макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера

и микроглиальных клеток; рекрутирование Syk, ZAP70 или обоих в комплекс DAP12/TREM2; повышение активности одного или более TREM2-зависимых генов, необязательно, когда один или более TREM2-зависимых генов содержат факторы транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT); повышение выживаемости дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера, микроглии, микроглии M1, активированной микроглии M1 и микроглии M2 или любой их комбинации; модулированную экспрессию одной или более стимулирующих молекул, выбранных из CD83, CD86 MHC класса II, CD40 и любой их комбинации, необязательно, когда CD40 экспрессируется на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах или любой их комбинации, и необязательно, когда дендритные клетки содержат дендритные клетки костного мозга; улучшение памяти; и уменьшение когнитивного дефицита. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению улучшают память и/или уменьшают когнитивный дефицит при введении индивиду.

[0176] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит одно или более из: (a) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 34; (b) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 35; и (c) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 31; и/или при этом переменный домен легкой цепи содержит одно или более из: (a) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности



95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 40; и (с) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 32.

[0178] В некоторых вариантах реализации антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность YAFSSDWMN (SEQ ID NO: 36), HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность RIYPGEGDTNYARKFHG (SEQ ID NO: 37), HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность ARLLRNKPGESYAMDY (SEQ ID NO: 38), и переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность RTSQSLVHSNAYTYLH (SEQ ID NO: 39), HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность KVSNRVS (SEQ ID NO: 40), и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SQSTRVPYT (SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность YAFSSQWMN (SEQ ID NO: 34), HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность RIYPGGGDTNYAGKFQG (SEQ ID NO: 35), HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность ARLLRNQPGESYAMDY (SEQ ID NO: 31), и переменная область легкой цепи, содержащая HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность RSSQSLVHSNRYTYLH (SEQ ID NO: 41), HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO: 33), и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SQSTRVPYT (SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит одну, две, три или четыре каркасные области, выбранные из VH FR1, VH FR2, FR3 VH и FR4 VH, где: FR1 VH содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11, FR2 VH содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 13, FR3 VH содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 15, и FR4 VH содержит последовательность SEQ ID NO: 16; и/или переменная область легкой цепи содержит одну, две, три или четыре каркасные области, выбранные из FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL и FR4 VL, где FR1 VL содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-20, FR2 VL содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и 22, FR3 VL



содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23 и 24, и FR4 VL содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 26.

[0179] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по крайней мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28; и/или переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, при этом переменный домен легкой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-L1, HVR-L2, и

HVR-L3 антитела AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью варибельного домена тяжелой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 и содержит замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена тяжелой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена тяжелой цепи антитела AL2p-47 или в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VH антитела AL2p-47 или SEQ ID NO: 28, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-H1 антитела AL2p-47, (b) аминокислотной последовательности HVR-H2 антитела AL2p-47 и (c) аминокислотной последовательности HVR-H3 антитела AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат последовательность варибельного домена легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью варибельного домена легкой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и содержат замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах

осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена легкой цепи антитела AL2p-47 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VL антитела AL2p-47 или SEQ ID NO: 29, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-L1 антитела AL2p-47, (b) аминокислотной последовательности HVR-L2 антитела AL2p-47 и (c) аминокислотной последовательности HVR-L3 антитела AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0180] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по крайней мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27; и/или переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-58 или

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела AL2p-58. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, при этом переменный домен легкой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела AL2p-58. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 и содержит замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VH антитела AL2p-58 или SEQ ID NO: 27, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) аминокислотной последовательности HVR-H1 антитела AL2p-58, (b) аминокислотной последовательности HVR-H2 антитела AL2p-58 и (c) аминокислотной последовательности HVR-H3 антитела AL2p-58. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат последовательность переменного домена легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере

85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью варибельного домена легкой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, и содержат замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи антитела AL2p-58 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VL антитела AL2p-58 или SEQ ID NO: 30, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-L1 антитела AL2p-58, (b) аминокислотной последовательности HVR-L2 антитела AL2p-58 и (c) аминокислотной последовательности HVR-L3 антитела AL2p-58. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и варибельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[0181] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; или тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

[0182] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

[0183] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи, при этом варибельный домен тяжелой цепи содержит одно или более из: (a) HVR-





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%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 67; и (с) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 68; и/или при этом переменный домен легкой цепи содержит одно или более из: (а) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 69; (b) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 70; и (с) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 71.

[0186] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по крайней мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56; и/или переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%



идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела 42E8.H1. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57, при этом переменный домен легкой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела 42E8.H1. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56 и содержит замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена тяжелой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены,

вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VH антитела 42E8.H1 или SEQ ID NO: 56, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-H1 антитела 42E8.H1, (b) аминокислотной последовательности HVR-H2 антитела 42E8.H1 и (c) аминокислотной последовательности HVR-H3 антитела 42E8.H1. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат последовательность переменного домена легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57, и содержат замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена легкой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности переменного домена легкой цепи антитела 42E8.H1 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VL антитела 42E8.H1 или SEQ ID NO: 57, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-L1 антитела 42E8.H1, (b) аминокислотной последовательности HVR-L2 антитела 42E8.H1 и (c) аминокислотной последовательности HVR-L3 антитела 42E8.H1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

[0187] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи включает

аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по крайней мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64; и/или переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена тяжелой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела RS9.F6. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного домена легкой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65, при этом переменный домен легкой цепи содержит аминокислотные последовательности HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела RS9.F6. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с

аминокислотной последовательностью варибельного домена тяжелой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64 и содержит замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена тяжелой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена тяжелой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VH антитела RS9.F6 или SEQ ID NO: 64, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-H1 антитела RS9.F6, (b) аминокислотной последовательности HVR-H2 антитела RS9.F6 и (c) аминокислотной последовательности HVR-H3 антитела RS9.F6. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат последовательность варибельного домена легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью варибельного домена легкой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 65, и содержат замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В определенных вариантах осуществления в аминокислотной последовательности варибельного домена легкой цепи антитела RS9.F6 или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно

содержит последовательность VL антитела RS9.F6 или SEQ ID NO: 65, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (a) аминокислотной последовательности HVR-L1 антитела RS9.F6, (b) аминокислотной последовательности HVR-L2 антитела RS9.F6 и (c) аминокислотной последовательности HVR-L3 антитела RS9.F6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

[0188] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по крайней мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72; и/или переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72 и содержит замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены,

вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VH SEQ ID NO: 72, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 по настоящему изобретению содержат последовательность переменного домена легкой цепи (VL), имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73, и содержат замены (например, консервативные замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности), но антитело к TREM2, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с TREM2. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в областях FR). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях FR. Антитело к TREM2 необязательно содержит последовательность VL SEQ ID NO: 73, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0189] В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 по настоящему изобретению представляет собой PSEG AL2p-58 huIgG1. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 по настоящему изобретению представляет собой AL2p-47 huIgG1.

**Таблица В: Последовательности**

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
1	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCP YDSMKHWGRRKAWCRQLGEGKGPCQRVVSTHNLWL LSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLY QCQSLHGSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWF PGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIF LIKILAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGY QLQTLPLGRDT	Белок TREM2 человека

2	<p>MGPLHQFLLLLITALSQALNTTVLQGMAGQSLRVSC          TYDALKHWGRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVW          LLAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVTITLKNLQAGDAG          LYQCQSLRGREAEVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDL          WVPEESSFEGAQVEHSTSRNQETSFPPTSILLLLACV          LLSKFLAASILWAVARGRQKPGTPVVRGLDCGQDAG          HQLQILTGPGGT</p>	<p>Белок          мышцы</p> <p>TREM2</p>
3	<p>MEPLHVFVLLLVTELSQUALNTTVLQGVAGQSLRVSC          TYDALRHWGRRKAWCRQLAEEGPCQRVVSTHGVW          LLAFLRKQNGSTVITDDTLAGTVTITLRNLQAGDAGL          YQCQSLRGREAEVLQKVVEVLEDPLDDQDAGDLW          VPEESESFEGAQVEHSTSSQVSSCGSPLTYHLPPKEPI          RKDLLPTHFHSSPPGLCPPEQASYSQHPLGCGQGQAE          AGDTCGQWARL</p>	<p>Белок          крысы</p> <p>TREM2</p>
4	<p>MPDPLFSAVQGKDKILHKALCICPWPGKGGMEPLRL          LILLFATELSGAHNTTVFQGVGQSLQVSCPYSMK          HWGRRKAWCRQLGEEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRR          RNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGFYQCQSLH          GSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWVPGESSEF          EDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSVLLLLACIFLIKILAA          SALWAAAWHGQKPGTHPPSEPDCGHDPGHQLQTLPL          GLRDT</p>	<p>Белок          макаки-резуса</p> <p>TREM2</p>
5	<p>MEPLRLLILLFATELSGAHNTTVFQGVGQSLQVSCP          YDSMKHWGRRKAWCRQLGEEKGPCQRVVSTHNLWL          LSFLRRRNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGFY          QCQSLHGSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWV          PGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSVLLLLACIF          LIKILAASALWAAAWHGQKPGTHPPSEPDCGHDPGH          QLQTLPLGLRDT</p>	<p>Белок          яванского макака</p> <p>TREM2</p>
6	<p>MEPLPLLILLSVAELSRGHNTTVFQGTAGRSLKVSCP          YNSLMHWGRRKAWCRQLGEDGPCQQVVSTHSLWL          LSFLKRRNGSTVITDDALGGILTITLRNLQAHDAGFY          QCQSLHGGEADTLRKVLVEVLADPLDHQEPGDLWIP</p>	<p>Белок          лошади</p> <p>TREM2</p>

	KESEFEDAQVEHSISRSLVEEEIPSLPTSILLLLACIFL SKLLAASAIWAAAWHGQKQETPPASEPDRGHDPGY QLHTLTGERDT	
7	METLGLLLLLWVAELSRHNTSVFQGTAGQSLRVSC SYNSLKHWRGRRKAWCRQLSEEGLCQHVVSTHPTWL LSFLKRRNGSTAITDDALGGTLTITLRNLQAHDAGLY QCQSLHGSEADTLKKVLVEVLADPLESQSKSFQDVQ MEHSISRNLSEESLFPPTSTLFLACVFLSKLLVASAL WAAAWHGKQRTSPAGGLDCGRDPGDQDQTLTDE LGESSDQDQTLTEL RDT	Белок свиньи TREM2
8	MEPLWLLILLA VTELSGAHNTTVFQGMAGRSLQVSC PYNSLKHWRGRRKAWCRQVDKEGPCQRVVSTHRSW LLSFLKRWNGSTAI VDDALGGTLTITLRNLQAHDAG LYQCQSLYGDEADTLRKVLVEVLADPLDHLDPGDL WIPEESKGFEDAHVEPSVSRSLSEEEIPFPPTSILFLLA CIFLSKFLAASALWAAAWRGQKLGTPQASELDCSCD PGYQLQTLTEPRDM	Белок собаки TREM2
9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASG	FR1 VH
10	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASG	FR1 VH
11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASG	FR1 VH
12	WVRQAPGQGLEWMG	FR2 VH
13	WVRQAPGQRLEWIG	FR2 VH
14	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	FR3 VH
15	RVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC	FR3 VH
16	WGQGTLVTVSS	FR4 VH
17	DVVM TQTPLSLSVTPGQPASISC	FR1 VL
18	GVVM TQTPLSLSVTPGQPASISC	FR1 VL
19	GVVMAQTPLSLSVTPGQPASISC	FR1 VL
20	DVVM TQSPDSLAVSLGERATINC	FR1 VL
21	WYLQKPGQSPQLLIY	FR2 VL



22	WYQQKPGQSPKLLIY	FR2 VL
23	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	FR3 VL
24	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	FR3 VL
25	FGQGTKLEIK	FR4 VL
26	FGGGTKVEIK	FR4 VL
27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMN WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTIT ADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLLRNQPGES YAMDYWGQGLVTVSS	AL2p-58 - Вариабельный домен тяжелой цепи
28	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSSDWMN WVRQAPGQGLEWMGRIYPGEGDTNYARKFHGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLLRNKPGE SYAMDYWGQGLVTVSS	AL2p-47 - Вариабельный домен тяжелой цепи
29	DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCRTSQSLVHSNAYTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTKLE IK	AL2p-47 - Вариабельная область легкой цепи
30	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVHSNRYT YLHWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTK LEIK	AL2p-58 - Вариабельная область легкой цепи
31	ARLLRNQPGESYAMDY	AL2p-58 - HVR- H3
32	SQSTRVPYT	AL2p-58; AL2p-47 - HVR-L3
33	KVSNRFS	AL2p-58 - HVR- L2
34	YAFSSQWMN	AL2p-58 - HVR- H1
35	RIYPGGGDTNYAGKFQG	AL2p-58 - HVR-

		H2
36	YAFSSDWMN	AL2p-47 - HVR-H1
37	RIYPGEGDTNYARKFHG	AL2p-47 - HVR-H2
38	ARLLRNKPGESYAMDY	AL2p-47 - HVR-H3
39	RTSQSLVHSNAYTYLH	AL2p-47 - HVR-L1
40	KVSNRVS	AL2p-47 - HVR-L2
41	RSSQSLVHSNRYTYLH	AL2p-58 - HVR-L1
42	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP	Константный домен 1 тяжелой цепи и шарнирная область изотипа IgG2 (CH1)
43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMN WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTIT ADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLLRNQPGES YAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	AL2p-58 huIgG1 PSEG - Тяжелая цепь
44	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMN	AL2p-58 huIgG1

	<p>WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTIT  ADTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARLLRNQPGE  YAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  EYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  VMHGALHNHYTQKSLSLSPG</p>	PSEG - Тяжелая цепь
45	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSSDWMN  WVRQAPGQGLEWMGRIYPGEGDTNYARKFHGRVTI  TAEDESTAYMELSSLRSEDТАVYYCARLLRNKPGE  SYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	AL2p-47 huIgG1 - Тяжелая цепь
46	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSSDWMN  WVRQAPGQGLEWMGRIYPGEGDTNYARKFHGRVTI  TAEDESTAYMELSSLRSEDТАVYYCARLLRNKPGE  SYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK</p>	AL2p-47 huIgG1 - Тяжелая цепь

	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
47	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVHSNRYT YLHWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	AL2p-58 huIgG1 PSEG - Легкая цепь
48	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRTSQSLVHSNAYTY LHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	AL2p-47 huIgG1 - Легкая цепь
49	D/Ex0-2Y <sub>xx</sub> L/IX6-8Y <sub>xx</sub> L/I	Рецепторный мотив
50	GYSITSDYAWN	CDR-H1 42E8.H1
51	YINYSGRTIYNPSLKS	CDR-H2 42E8.H1
52	ARWNGNYGFAY	CDR-H3 42E8.H1
53	RSSQSLVHINGNTYLH	CDR-L1 42E8.H1
54	KVSNRFS	CDR-L2 42E8.H1
55	SQTTHALFT	CDR-L3 42E8.H1
56	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWN WIRQFPGNKLEWMGYINYSGRTIYNPSLKSRIITRDT SKNHFFLQLISVTTEDTATYYCARWNGNYGFAYWG QGTLVTVSA	42E8.H1 Варибельная область тяжелой цепи
57	DWMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHINGNTYL HWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT	42E8.H1 Варибельная

	DFTLKISRVEAEDLGVY FCSQTTHALFTFGSGTKLEIK	область легкой цепи
58	GYTFTSY	CDR-H1 RS9.F6
59	IGRSDPTTGGTNYNE	CDR-H2 RS9.F6
60	VRTSGTGDY	CDR-H3 RS9.F6
61	RSSQSLVHNNGNTFLH	CDR-L1 RS9.F6
62	VSNRFS	CDR-L2 RS9.F6
63	SQTTHVPPT	CDR-L3 RS9.F6
64	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMH WVKQSPGRGLEWIGRSDPTTGGTNYNEKFKTKATLT VDKPSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCVRTSGTGDYW GQGTSMTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVT	RS9.F6 Вариабельная область тяжелой цепи
65	DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHNNGNTF LHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEI KRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCF	RS9.F6 Вариабельная область легкой цепи
66	GFTFTDFY	WO2018/015573, Консенсусная CDR-H1
67	IRNKANGYTT	WO2018/015573, Консенсусная CDR-H2
68	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, Консенсусная CDR-H3
69	QSLLYSENNQDY	WO2018/015573, Консенсусная CDR-L1
70	GAS	WO2018/015573, Консенсусная

		CDR-L2
71	EQTYSYPYT	WO2018/015573, Консенсусная CDR-L3
72	EVKLLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKANGYTTTEYNPSVKGRFT ISRDNTQNMLYLQMNTLR*EDTATYYCARIGINNGG SLDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573, Консенсусная Вариабельная область тяжелой цепи Звездочка (*) в последовательнос ти может быть любой аминокислотой.
73	DILINQSPASLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENNQD YLAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVPDRFTGSGS GTDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPTYTFGAGTKL ELK	WO2018/015573, Консенсусная Вариабельная область легкой цепи
74	GFTFTDFY	WO2018/015573, 14D3 CDR-H1
75	IRNKTKGYTT	WO2018/015573, 14D3 CDR-H2
76	ARIGVNNGGSLDYWG	WO2018/015573, 14D3 CDR-H3
77	QSLLYSENNQDY	WO2018/015573, 14D3 CDR-L1
78	GAS	WO2018/015573,

		14D3 CDR-L2
79	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 14D3 CDR-L3
80	EVKLLEFGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGRAPEWLGLIRNKTKGYTTEYNRSVKGRFT ISRDNQTNMLYLQMNSLRPEDTATYYCARIGVNNGG SLDYWGQGVMTVSS	WO2018/015573, 14D3 Варибельная область тяжелой цепи
81	DILIQSPASLTVSAGARVTMSCKSSQSLLYSENNQDY LAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTKLE LK	WO2018/015573, 14D3 Варибельная область легкой цепи
82	GFTFTDFY	WO2018/015573, 14D8 CDR-H1
83	IRNKANGYTT	WO2018/015573, 14D8 CDR-H2
84	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, 14D8 CDR-H3
85	QSLLYSEKNQDY	WO2018/015573, 14D8 CDR-L1
86	GAS	WO2018/015573, 14D8 CDR-L2
87	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 14D8

		CDR-L3
88	EVKLLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKANGYTTVYNPSVKGRFT ISRDNTQNMLYLQMNTLRGEDTATYYCARIGINNGG SLDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573, 14D8 Вариабельная область тяжелой цепи
89	DILINQSPASLTVSTGEKVTMSCRSSQSLLYSEKNQD YLAWYQQKPGQFPKLLIYGASYRHTGVPDRFTGSGS GTDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTKL ELK	WO2018/015573, 14D8 Вариабельная область легкой цепи
90	GFTFTDFY	WO2018/015573, 7A12 CDR-H1
91	IRNKANGYTT	WO2018/015573, 7A12 CDR-H2
92	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, 7A12 CDR-H3
93	QSLLYSEKNQDY	WO2018/015573, 7A12 CDR-L1
94	GAS	WO2018/015573, 7A12 CDR-L2
95	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 7A12 CDR-L3
96	EVKLLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKANGYTTQYNPSVKGRFT ISRDNTQNMLYLQMNTLRGEDTATYYCARIGINNGG	WO2018/015573, 7A12 Вариабельная



	SLDYWGQGVMVTVSS	область тяжелой цепи
97	DILINQSPASLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSEKNQD YLAWYQQKPGQSPKLLMYGASYRHTGVPDRFTGSG SGTDFTLTISVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTK LELK	WO2018/015573, 7A12 Вариабельная область легкой цепи
98	GFTFTDFY	WO2018/015573, 8A11 CDR-H1
99	IRNKTKGYTT	WO2018/015573, 8A11 CDR-H2
100	ARIGVNNGGSLDYWG	WO2018/015573, 8A11 CDR-H3
101	QSLLYSENNQDY	WO2018/015573, 8A11 CDR-L1
102	GAS	WO2018/015573, 8A11 CDR-L2
103	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 8A11 CDR-L3
104	EVKLLESGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKTKGYTTEYNTSVKGRFT ISRDNQNMPLYLQMNSLRPEDTATYYCARIGVNNGG SLDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573, 8A11 Вариабельная область тяжелой цепи
105	DILIQSPASLTVSAGARVTMSCKSSQSLLYSENNQDY LAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVPDRFTGSGSG	WO2018/015573, 8A11

	TDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTKLE LK	Вариабельная область легкой цепи
106	GFTFTDFY	WO2018/015573, 21A3 CDR-H1
107	IRNKANGYTT	WO2018/015573, 21A3 CDR-H2
108	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, 21A3 CDR-H3
109	QSLLYSEKNQDY	WO2018/015573, 21A3 CDR-L1
110	GAS	WO2018/015573, 21A3 CDR-L2
111	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 21A3 CDR-L3
112	EVKLLESGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKANGYTTQYNPSVKGRFT ISRDNQTNMLYLQMNTLRGEDTATYYCARIGINNGG SLDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573, 21A3 Вариабельная область тяжелой цепи
113	DILINQSPASLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSEKNQD YLAWYQQKPGQSPKLLMYGASYRHTGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTK LELK	WO2018/015573, 21A3 Вариабельная область легкой цепи
114	GFTFTDFY	WO2018/015573,

		10C3 CDR-H1
115	IRNKTKGYTT	WO2018/015573, 10C3 CDR-H2
116	ARIGTNNGGSLDYWG	WO2018/015573, 10C3 CDR-H3
117	QSLLYSENNQDY	WO2018/015573, 10C3 CDR-L1
118	GAS	WO2018/015573, 10C3 CDR-L2
119	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 10C3 CDR-L3
120	EVKLLES GGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGETPEWLGLIRNKTKGYTTEYNPSVKGRFTI SRDNTQNMLYLQMNSLRPEDTATYYCARIGTNNGG SLDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573, 10C3 Вариабельная область тяжелой цепи
121	DILIQSPASLTVSAGARVTMSCKSSQSLLYSENNQDY LAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTKLE LK	WO2018/015573, 10C3 Вариабельная область легкой цепи
122	GFTFTDFY	WO2018/015573, 18F9 CDR-H1
123	IRNKVNGYRT	WO2018/015573, 18F9

		CDR-H2
124	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, 18F9 CDR-H3
125	QSLLYSENNQDY	WO2018/015573, 18F9 CDR-L1
126	GAS	WO2018/015573, 18F9 CDR-L2
127	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 18F9 CDR-L3
128	EVKLLESGGGLVQPGGSMRLSCVVS GFTFTDFYMN WIRQAAGKAPEWLGLIRNKVNGYRTEYNPSVKGRFT ISRDNIQNMLYLQMNTLRAEDTATYYCARIGINNGG SLDYWGQGVMTVSS	WO2018/015573, 18F9 Вариабельная область тяжелой цепи
129	DILINQSPASLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENNQD YLAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVPDRFTGSGS GTDFTLTISVQAEDLADYYCEQTYSYPYTFGAGTKL ELK	WO2018/015573, 18F9 Вариабельная область легкой цепи
130	GFTFTDFY	WO2018/015573, 15C5 CDR-H1
131	IRNKAYGYTT	WO2018/015573, 15C5 CDR-H2
132	ARIGINYGGSLDYWG	WO2018/015573, 15C5 CDR-H3

133	QSLLYSESNQDY	WO2018/015573, 15C5 CDR-L1
134	GAS	WO2018/015573, 15C5 CDR-L2
135	EQTYSYPYT	WO2018/015573, 15C5 CDR-L3
136	EVKLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMN WIRQPAGKAPEWLGLIRNKAYGYTTEYNPSVKGRFT ISRDNQDMLYLQMNTRLAEDTATYYCARIGINYGG SLDYWGQGVMTVSS	WO2018/015573, 15C5 Варибельная область тяжелой цепи
137	DILINQSPASLTVSAGEKVTVSCKSSQSLLYSESNQDY LAWYQQKPGQFPKLLIYGASYRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLAHYEYCEQTYSYPYTFGAGTKLE LK	WO2018/015573, 15C5 Варибельная область легкой цепи
138	GFTFTDFY	WO2018/015573, 1G6 CDR-H1
139	IRNKANGFTT	WO2018/015573, 1G6 CDR-H2
140	ARIGINNGGSLDYWG	WO2018/015573, 1G6 CDR-H3
141	QSLLYSENKQDY	WO2018/015573 1G6 CDR-L1
142	GAS	WO2018/015573

		1G6 CDR-L2
143	EQTYSYPYT	WO2018/015573 1G6 CDR-L3
144	EVKLLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFTDFYMNW IRQPAGKAPEWLGLIRNKANGFTTEYNPSVKGRFTIS RDNTQHMLYLQMNTRLAEDTATYYCARIGINNGGS LDYWGQGVMVTVSS	WO2018/015573 1G6 Варибельная область тяжелой цепи
145	DILINQSPASLTVSTGEKVTMSCKSSQSLLYSENKQD YLAWYQQKPGQFPKLLIYGASNRHTGVPDRFTGSGS GTDFTLTINIVQAEDLADYYCEQTYSPYTFGAGTKL ELK	WO2018/015573 1G6 Варибельная область легкой цепи

[0190] Любое из антител по настоящему изобретению может продуцироваться линией клеток. В некоторых вариантах осуществления линия клеток может представлять собой линию клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия может представлять собой линию клеток гибридомы. В других вариантах осуществления линия клеток может представлять собой линию клеток дрожжей. Любая линия клеток, известная в данной области техники, пригодная для продукции антител, может быть использована для продукции антител по настоящему изобретению. Примеры линий клеток для продукции антител описаны в настоящем документе.

#### *Фрагменты антител*

[0191] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к фрагментам антител, которые связываются с одним или более человеческими TREM2, природным вариантом человеческого TREM2 и связанным с заболеванием вариантом человеческого TREM2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv.

#### *Каркасные области антител*

[0192] Любое из описанных в данном документе антител дополнительно включает каркас. В некоторых вариантах осуществления каркас представляет собой каркас иммуноглобулина человека. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело (например, антитело к TREM2) содержит HVR, как в любом из вышеперечисленных вариантов осуществления, и дополнительно содержит акцепторный каркас человека, например, каркас иммуноглобулина человека или консенсусный каркас человека.

Человеческие каркасные области иммуноглобулина могут быть частью человеческого антитела или нечеловеческое антитело может быть гуманизировано путем замены одной или более эндогенных каркасных областей человеческими каркасными областями. Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрелые каркасные области человека (соматически мутированные) или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro and Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные из скрининговых библиотек FR (см., например, Vaca et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

#### *Получение антитела*

[0193] Антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут включать поликлональные антитела, моноклональные антитела, гуманизированные и химерные антитела, человеческие антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, и F(ab')<sub>2</sub>), биспецифические и полиспецифические антитела, поливалентные антитела, антитела, полученные из библиотеки, антитела с модифицированными эффекторными функциями, слитые белки, содержащие часть антитела, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена, такой как эпитоп, содержащий аминокислотные остатки белка TREM2 по настоящему изобретению, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитела к TREM2 могут быть человеческого, мышинового, крысиного или любого другого происхождения (включая химерные или гуманизированные антитела).

#### *(1) Поликлональные антитела*

[0194] Поликлональные антитела, такие как поликлональные антитела к TREM2, как правило, вырабатываются у животных с помощью многократных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезно конъюгировать соответствующий антиген (например, очищенный или рекомбинантный белок TREM2 по настоящему изобретению) с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации, например, гемоцианином моллюска *Megathura crenulata* (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например, сложного эфира малеимидобензолсульфосукцинимид (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, ангидрида янтарной

кислоты,  $\text{SOCl}_2$ , от  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  независимо представляют собой низшие алкильные группы. Примеры адъювантов, которые могут применяться, включают полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфорил липид А, синтетический дикориномиколат трегалозы). Специалист в данной области техники сможет выбрать протокол иммунизации без проведения необязательных экспериментов.

[0195] Животных иммунизируют против желаемого антигена, иммуногенных конъюгатов или производных, путем комбинирования, например, 100 мкг (для кроликов) или 5 мкг (для мышей) белка или конъюгата с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и введения раствора внутривенно в нескольких местах. Через месяц животным вводят бустерную дозу, содержащую от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько участков. Через семь-четырнадцать дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антител. Животным вводят бустерную дозу до достижения фазы плато для титра антител. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа подходят агрегирующие агенты, такие как алюминиевые квасцы.

## (2) Моноклональные антитела

[0196] Моноклональные антитела, такие как моноклональные антитела к TREM2, получают из популяции по существу однородных антител, т. е., из популяции, отдельные антитела в которой являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, модификатор «моноклональное» указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител.

[0197] Например, моноклональные антитела к TREM2 могут быть получены с использованием гибридного метода, впервые описанного Köhler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (патент США № 4816567).

[0198] В гибридном методе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, как описано выше, для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации (например, очищенный или рекомбинантный белок TREM2 по настоящему изобретению). В альтернативном варианте лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией, такой как клетки миеломы, с использованием подходящего связующего агента, такого как полиэтиленгликоль, для образования гибридной клетки (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

[0199] Культуральную среду, в которой культивируют гибридные клетки, можно проанализировать на наличие моноклональных антител, направленных против желаемого



антигена (например, белка TREM2 по настоящему изобретению), например, как определено при помощи иммунопреципитации или анализ связывания *in vitro*, такой как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Такие методы и анализы хорошо известны в данной области техники.

[0200] После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы, а моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть выделены из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, такие как, например, хроматография на протеин А-сефарозе, хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ, аффинная хроматография и другие способы, как описано выше.

[0201] Моноклональные антитела к TREM2 также могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, например, как описано выше. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые специфически связываются с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Гибридные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые не производят белок иммуноглобулина иным способом, для синтеза моноклональных антител в таких рекомбинантных клетках-хозяевах. Статьи с обзорами рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plückthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188 (1992).

[0202] В некоторых вариантах осуществления антитела к TREM2 можно выделить из фаговых библиотек антител, полученных с использованием методик, описанных в публикации McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описали выделение антител мыши и человека, соответственно, из фаговых библиотек. Последующие публикации описывают получение антител человека с высокой аффинностью (наномолярный («нМ») диапазон) путем перетасовки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекцией и рекомбинацией *in vivo* как стратегией создания очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)).

[0203] ДНК, кодирующая антитела или их фрагменты, также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепи человека на гомологичные мышиные последовательности (патент США № 4816567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или путем ковалентного присоединения к кодирующей иммуноглобулин последовательности всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Как правило, такие неиммуноглобулиновые полипептиды являются замещенными в

константных доменах антитела или являются замещенными в переменных доменах одного антигенсвязывающего участка антитела с целью создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность для антигена, и другой антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность для другого антигена.

*(3) Гуманизированные антитела*

[0204] Антитела к TREM2 по данному изобретению или их фрагменты могут дополнительно включать гуманизированные или человеческие антитела. Гуманизированные формы антител нечеловеческого происхождения (*например*, мышьиные) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fab, Fab'-SH, F<sub>v</sub>, scFv, F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR) реципиента заменяются остатками из CDR видов, отличных от человека (донорское антитело), таких как мышь, крыса или кролик, имеющих желаемую специфичность, аффинность и функциональную возможность. В некоторых случаях каркасные остатки F<sub>v</sub> человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркаса. В общем, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все области CDR соответствуют таковому нечеловеческому иммуноглобулину, и все или практически все области FR являются такими, как консенсусная последовательность иммуноглобулина человека. В некоторых случаях гуманизированное антитело оптимально также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988) and Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

[0205] В данной области техники известны определенные способы гуманизации нечеловеческих антител против TREM2. Как правило, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника нечеловеческого происхождения. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называются «импортными» остатками, которые, как правило, взяты из «импортного» переменного домена. Гуманизацию можно по существу провести по методу Винтера с сотрудниками, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988), или путем замены CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела представляют собой

химерные антитела (патент США № 4816567), в которых значительно меньше интактного переменного домена человека заменено соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

[0206] Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител может влиять на иммуногенность. Согласно так называемому методу «наилучшего соответствия» проводится скрининг последовательности переменного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей переменного домена. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается за человеческий каркас (FR) для гуманизированного антитела. Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). В другом методе используют конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Аналогичную каркасную область можно использовать для нескольких разных гуманизированных антител. Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993).

[0207] Гуманизированные антитела предпочтительно сохраняют высокую аффинность к антигену и другие благоприятные биологические свойства. Для достижения этой цели в соответствии с предпочтительным способом получают гуманизированные антитела в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко доступны и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулина. Проверка этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности кандидатного иммуноглобулина, то есть, анализировать остатки, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать его антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из реципиентной и импортируемой последовательностей, так что достигается желаемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к целевому антигену или антигенам (например, белкам TREM2 по настоящему изобретению). В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в воздействие на связывание с антигеном.

[0208] Рассматриваются различные формы гуманизированного антитела к TREM2. Например, гуманизированное антитело к TREM2 может представлять собой фрагмент антитела, такой как Fab, или интактное антитело, такое как интактное антитело IgG1.

#### (4) Фрагменты антител

[0209] В некоторых вариантах осуществления преимущества использования фрагментов антител к TREM2 выше, чем целых антител к TREM2. В некоторых вариантах осуществления фрагменты меньшего размера обеспечивают быстрый клиренс и лучшее проникновение в головной мозг.

[0210] Были разработаны различные способы для производства фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты были получены путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Однако теперь эти фрагменты могут быть получены непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами, например, с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих антитела к TREM2 по настоящему изобретению. Все фрагменты Fab, Fv и scFv антител могут экспрессироваться и секретироваться из E. coli, что позволяет напрямую производить большое количество этих фрагментов. Фрагменты антител к TREM2 также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, как обсуждалось выше. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из E. coli и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')<sub>2</sub> могут быть выделены непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Получение фрагментов Fab и F(ab')<sub>2</sub> антител с увеличенным периодом полужизни in vivo описано в патенте США № 5869046. В других вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Фрагмент антитела к TREM2 также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

#### *(5) Биспецифические и полиспецифические антитела*

[0211] Биспецифические антитела (бсАт) представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами, включая эпитопы одного и того же или другого белка (например, одного или более белков TREM2 по настоящему изобретению). Альтернативно, одна часть бсАт может быть оснащена для связывания с целевым антигеном TREM2, а другая часть может быть объединена с плечом, которое связывается со вторым белком. Такие антитела могут быть получены из полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')<sub>2</sub>).

#### *(6) Модификация эффекторных функций*

[0212] Также может быть желательно модифицировать антитело к TREM2 по данному изобретению для модификации эффекторной функции и/или увеличения периода полужизни антитела в сыворотке. Например, сайт связывания Fc-рецептора в константной области может быть модифицирован или мутирован для удаления или уменьшения аффинности связывания с определенными Fc-рецепторами, такими как FcγRI, FcγRII, и/или FcγRIII для снижения антителозависимой клеточно-опосредованной

цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция нарушается путем удаления N-гликозилирования области Fc (например, в домене CH 2 IgG) антитела. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция нарушается путем модификации областей, таких как 233-236, 297 и/или 327-331 IgG человека, как описано в РСТ WO 99/58572 и Armour et al., *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). В других вариантах осуществления также может быть желательно модифицировать антитело к TREM2 по настоящему изобретению, чтобы изменить эффекторную функцию, чтобы повысить селективность обнаружения в отношении ИТМ-содержащего FcγRIIIb (CD32b) для увеличения кластеризации антител к TREM2 на соседних клетках без активации гуморальных ответов, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность и антителозависимый клеточный фагоцитоз.

[0213] Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке можно включить в антитело (особенно во фрагмент антитела) связывающий рецептор реутилизации эпитоп, как описано, например, в патенте США 5739277. Используемый в данном документе термин «*эпитоп, связывающий рецептор реутилизации*» относится к эпитопу области Fc молекулы IgG (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, или IgG<sub>4</sub>), который отвечает за увеличение *in vivo* времени полужизни в сыворотке молекула IgG.

(7) *Другие модификации аминокислотной последовательности.*

[0214] Также рассматриваются модификации аминокислотной последовательности антител к TREM2 по настоящему изобретению или их фрагментов. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антител или фрагментов антител. Варианты аминокислотной последовательности антител или фрагментов антител получают путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или фрагменты антител, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены производится для получения окончательной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками (т.е., способность связываться или физически взаимодействовать с белком TREM2 по данному изобретению). Аминокислотные изменения также могут менять посттрансляционные процессы антител, такие как изменение числа или позиции участков гликозилирования.

[0215] Полезный способ идентификации определенных остатков или областей антитела к TREM2, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», как описано Cunningham и Wells в *Science*, 244:1081-1085 (1989). В данном случае определяют остаток или группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) для воздействия на взаимодействие аминокислот с целевым

антигеном. Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к замещениям, затем уточняют введением дополнительных или других вариантов на сайтах замещения или около них. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности предопределены, *сама по себе* природа мутации не должна быть предопределена. Например, для анализа эффективности мутации в данном сайте проводят аланин-сканирующий или случайный мутагенез в целевом кодоне или области, а экспрессированные варианты антител проверяют на желаемую активность.

[0216] Вставки аминокислотной последовательности включают амино- («N») и/или карбокси-концевые («C») гибриды, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полужизни антитела в сыворотке крови.

[0217] Другой тип варианта представляет собой вариант замены аминокислоты. В этих вариантах по крайней мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен другим остатком. Сайты, представляющие наибольший интерес для мутагенеза с применением замещений, включают гипервариабельные области, но также предполагают изменения FR. Консервативные замены показаны в Таблице С ниже под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно ввести более существенные изменения, обозначенные как «иллюстративные замены» в таблице С, или как описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и провести скрининг продуктов.

**Таблица С: Аминокислотные замены**

<b>Исходный остаток</b>	<b>Иллюстративные замены</b>	<b>Предпочтительные замены</b>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	leu

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	leu

[0218] Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) объема боковой цепи. Естественным образом встречающиеся в природе остатки возможно разделить на группы, основанные на общих свойствах боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0219] Неконсервативные замены подразумевают замену члена одного из этих классов членом другого класса.

[0220] Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации антитела, также можно заменить, как правило, серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения неправильного перекрестного связывания. И наоборот, цистеиновые связи могут быть добавлены к антителу для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело является фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

[0221] Особенно предпочтительный тип варианта с заменой содержит замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела к TREM2). Как правило, полученные варианты, выбранные для дальнейшей разработки, будут иметь улучшенные биологические свойства относительно исходного антитела, из которого они образуются.

Удобный способ генерации таких вариантов замен включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для получения всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Созданные таким образом варианты антител отображаются моновалентным образом из частиц нитевидного фага в виде продуктов слияния с продуктом гена III M13, упакованных в каждой частице. Затем проводят скрининг отображенных фагом вариантов в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как описано в данном документе. Чтобы идентифицировать потенциальные сайты гипервариабельных регионов для модификации может быть выполнен аланин-сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих связыванию антигена. Альтернативно или дополнительно может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между антителом и антигеном (например, белком TREM2 по настоящему изобретению). Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для проведения замен в соответствии с применяемыми в данном документе методиками. Когда такие варианты сгенерированы, панель вариантов подвергается скринингу, в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе, и антитела с превышающими прочие свойствами в одном или более соответствующих анализах могут быть выбраны для дальнейшей разработки. В качестве альтернативы антитела человека также могут быть получены с использованием дрожжевых библиотек и способов, как описано, например, в публикациях WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568; и Xu et al., Protein Eng. Des. Sel., 26(10): 663-70 (2013).

[0222] Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный профиль гликозилирования антитела. Под изменением понимают удаление одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, отсутствующих в антителе.

[0223] Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно применять 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

[0224] Добавление сайтов гликозилирования к антителу обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она



содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение может также быть выполнено путем добавления одного или более остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела или замены ими (для сайтов O-связанного гликозилирования).

*(8) Другие модификации антител*

[0225] Антитела к TREM2 по настоящему изобретению или их фрагменты антител могут быть дополнительно модифицированы, чтобы они содержали дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области техники и легко доступны, или чтобы они содержали различные типы конъюгатов с лекарственными средствами, которые известны в данной области техники и легко доступны. Предпочтительно фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, представляют собой водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1, 3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), декстран или поли(п-винилпирролидон) полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры оксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущество при производстве вследствие его стабильности в воде. Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может изменяться и, в случае присоединения более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить с учетом факторов, включающих, без ограничений, конкретные свойства или функции антитела, подлежащие улучшению, независимо от того, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т. д. Такие методики и другие подходящие составы описаны в публикации Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

[0226] Конъюгация лекарственного средства включает соединение биологически активной цитотоксической (противораковой) полезной нагрузки или лекарственного средства с антителом, которое специфически нацелено на определенный маркер опухоли (например, белок, который в идеале должен быть обнаружен только в опухолевых клетках или на них). Антитела отслеживают эти белки в организме и прикрепляются к поверхности раковых клеток. Биохимическая реакция между антителом и целевым белком (антигеном) запускает сигнал в опухолевой клетке, которая затем поглощает или интернализует антитело вместе с цитотоксином. После интернализации ADC цитотоксический препарат высвобождается и уничтожает злокачественное

новообразование. Благодаря такому нацеливанию в идеале лекарственное средство имеет меньше побочных эффектов и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие химиотерапевтические агенты. Раскрыты способы конъюгации антител, известные в данной области техники (см., например, Jane de Lartigue, OncLive July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; and Ducry et al., (2010). Bioconjugate Chemistry 21 (1): 5-13).

*(9) Количественные исследования связывания и другие количественные исследования*

[0227] Антитела к TREM2 по настоящему изобретению можно тестировать на антигенсвязывающую активность, например, известными способами, такими как ИФА, вестерн-блоттинг и т. д.

[0228] Подробные иллюстративные способы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

#### **Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева**

[0229] Антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В некоторых вариантах осуществления представлены выделенные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, кодирующую любое из антител к TREM2 по настоящему изобретению. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела к TREM2 (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления также предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансдуцирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, а клетка яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20). Клетки-хозяева по настоящему изобретению также включают, но не ограничиваются этим, выделенные клетки, клетки, культивируемые *in vitro*, и клетки, культивируемые *ex vivo*.

[0230] Предложены способы получения антитела к TREM2 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование

клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к TREM2, в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

[0231] Для рекомбинантного получения антитела к TREM2 по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к TREM2, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антитела).

[0232] Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител к TREM2 по настоящему изобретению или фрагменты их полипептидов (включая антитела), описанные в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, клонирующие векторы и векторы экспрессии. Подходящие векторы для клонирования могут быть сконструированы в соответствии со стандартными методами или могут быть выбраны из большого количества векторов клонирования, доступных в данной области техники. 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. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фагов и «челночные» векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие клонирующие векторы доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

[0233] Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и вектор(-ы) экспрессии, раскрытые в публикации РСТ № WO 87/04462. Компоненты вектора обычно могут включать в себя, но не ограничиваться ими, один или более из следующих элементов: сигнальную последовательность; точку начала репликации; один или более маркерных генов; подходящие элементы контроля транскрипции (такие как промоторы, энхансеры и терминаторы). Для экспрессии (то есть, трансляции) обычно требуются один или более контролирующих транскрипцию элементов, таких как сайты связывания

рибосомы, сайты инициации трансляции и стоп-кодона.

[0234] Векторы, содержащие представляющие интерес нуклеиновые кислоты, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих средств, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; баллистическую трансфекцию; липофекцию; и инфекцию (например, где вектор является инфекционным агентом, таким как вирус коровьей оспы). Выбор вводящихся векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от особенностей клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую одну или более аминокислотных последовательностей, кодирующих антитело к TREM2 по настоящему изобретению.

[0235] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела к TREM2 по настоящему изобретению могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях (например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523; и публикации Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254 описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

[0236] В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии для векторов, кодирующих антитела, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антител с частичным или полностью человеческим профилем гликозилирования (например, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

[0237] В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут быть подходящими линии клеток млекопитающих, которые приспособлены для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК); клетки почки новорожденного хомяка (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие

подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе DHFR- клетки CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) и линии миеломных клеток, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

#### **Фармацевтические композиции и составы**

[0238] В данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к TREM2 по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело к TREM2 по настоящему изобретению, имеющее желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, эксципiente или стабилизаторе (Remington's *Pharmaceutical Sciences* (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

[0239] В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие антитело к TREM2, представлены в составе с фармацевтически приемлемым носителем (см., например, Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20th ed. (2003); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

#### **Фармацевтические дозировки и введение**

[0240] Предусмотренное в данном документе антитело к TREM2 можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральный, внутрилегочный, интраназальный, внутриочаговый, интрацереброспинальный, внутрочерепной, внутриспинальный, интрасиновиальный, интратекальный, пероральный, местный или ингаляционный пути. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное введение в виде болюса или непрерывную инфузию в течение определенного периода времени, внутриартериальное, внутрисуставное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется подкожно. Введение дозы может осуществляться любым подходящим путем, *например*, инъекциями, такими как внутривенные или

подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или хроническим. В данном документе рассматриваются различные схемы дозирования, включая, без ограничений, одноразовое или многократное введение через временные промежутки, в виде одноразовой дозы введения и импульсной инфузии.

[0241] Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела к TREM2 будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, конкретного антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также усмотрения лечащего врача. Антитело легко вводить пациенту одноразово или в течение серии курсов лечения.

#### **Наборы/промышленные изделия**

[0242] В настоящем изобретении также представлены наборы, содержащие выделенное антитело по настоящему изобретению (например, описанное в данном документе антитело против TREM2) или его функциональный фрагмент. Наборы по настоящему изобретению могут включать один или более контейнеров, содержащих очищенное антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно включают инструкции по применению в соответствии со способами настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления эти инструкции содержат описание введения выделенного антитела по настоящему изобретению (например, антитела к TREM2, описанного в данном документе) для предотвращения, снижения риска развития или лечения индивида, имеющего заболевание, нарушение или поражение, выбранное из следующего: лейкоэнцефалопатия с дебютом в детском возрасте; лейкоэнцефалопатия с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP); лейкоэнцефалопатия, диффузная наследственная, со сфероидными; лейкодистрофия с дебютом во взрослом возрасте с нейроаксональными сфероидными; аутосомно-доминантная лейкоэнцефалопатия с нейроаксональными сфероидными; наследственная диффузная лейкоэнцефалопатия с аксональными сфероидными (HDLS); нейроаксональная лейкодистрофия; пигментная ортохроматическая лейкодистрофия; и семейная пигментная ортохроматическая лейкоэнцефалопатия (POLD), согласно любым способам по настоящему изобретению.

[0243] В некоторых вариантах осуществления инструкции содержат описание того, как обнаружить белок TREM2, например, у индивида, в образце ткани или в клетке. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивида, подходящего для лечения, на основе определения наличия у этого индивида заболевания и стадии заболевания.

[0244] В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно содержать другое антитело по настоящему изобретению (например, по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольной точки, по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, и/или по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается с белком стимулирующей контрольной точки) и/или

по меньшей мере один стимулирующий цитокин. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать инструкции по применению антитела и/или стимулирующего цитокина в комбинации с выделенным антителом по настоящему изобретению (например, антитело к TREM2, описанное в данном документе), инструкции по применению выделенного антитела по настоящему изобретению в комбинации с антителом и/или стимулирующим цитокином, или инструкции по применению выделенного антитела по настоящему изобретению и антитела и/или стимулирующего цитокина в соответствии с любыми способами по настоящему изобретению.

[0245] Инструкции обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой одноразовые дозы, многократные дозы (например, мультидозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по данному изобретению, обычно представляют собой инструкции на этикетке или листок-вкладыш (например, лист бумаги, включенный в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, которые хранятся на магнитном или оптическом диске).

[0246] На этикетке или листке-вкладыше указано, что композиция используется для лечения, например, заболевания по настоящему изобретению. Инструкции могут быть предоставлены для применения любого из методов, описанных в данном документе.

[0247] Наборы по данному изобретению находятся в подходящей упаковке. Пригодная упаковка включает в себя, но не ограничивается этим, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Также рассматриваются упаковки для применения в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, аэрозольный ингалятор) или инфузионное устройство, такое как мини-насос. Набор может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может быть пакетом раствора для внутривенного введения или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Контейнер может также иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может быть пакетом раствора для внутривенного введения или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой выделенное антитело по настоящему изобретению (например, антитело к TREM2, описанное в данном документе). Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

[0248] Наборы могут необязательно предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующую информацию. Как правило, набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш(-и) внутри или соединенные с контейнером.

[0249] Данное изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Все цитаты во всем описании включены в данный документ посредством

ССЫЛКИ.

### **Биомаркеры**

[0250] В определенных вариантах осуществления уровни CSF1R используются в качестве биомаркера активности антитела к TREM2, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления антитело TREM2, которое вводят субъекту, значительно индуцирует экспрессию CSF1R или повышает уровни CSF1R по сравнению с субъектом, не получавшим лечение, или субъектом, получавшим контрольное антитело или плацебо. В определенных вариантах осуществления антитело TREM2 повышает уровни РНК или белка CSF1R. В определенных вариантах осуществления антитело к TREM2 повышает уровни РНК CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления антитело к TREM2 повышает уровни белка CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R повышены в головном мозге, например, при обнаружении в спинномозговой жидкости. В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R повышены во фронтальном кортексе. В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R повышены в гиппокампе. В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R повышены в плазме. В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R используются в качестве биомаркера активности агонистического антитела к TREM2. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни РНК CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни белка CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни РНК или белка CSF1R в головном мозге, например, при обнаружении в спинномозговой жидкости. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни РНК или белка CSF1R во фронтальном кортексе. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни РНК или белка CSF1R в гиппокампе. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к TREM2 повышает уровни РНК или белка CSF1R в плазме.

[0251] В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R используются в качестве биомаркера активности huIgG1 PSEG AL2p-58. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 повышает уровни РНК CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 повышает уровни белка CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 повышает уровни РНК или белка CSF1R в головном мозге, например, при обнаружении в спинномозговой



жидкости. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 увеличивает уровни РНК или белка CSF1R во фронтальном кортексе. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 увеличивает уровни РНК или белка CSF1R в гиппокампе. В определенных вариантах осуществления huIgG1 PSEG AL2p-58 увеличивает уровни РНК или белка CSF1R в плазме.

[0252] В определенных вариантах осуществления уровни РНК или белка CSF1R используются в качестве биомаркера активности huIgG1 AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 повышает уровни РНК CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 повышает уровни белка CSF1R, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80, 90% или 100%. В определенных вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 повышает уровни РНК или белка CSF1R в головном мозге, например, при обнаружении в спинномозговой жидкости. В определенных вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 увеличивает уровни РНК или белка CSF1R во фронтальном кортексе. В определенных вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 увеличивает уровни РНК или белка CSF1R в гиппокампе. В некоторых вариантах осуществления huIgG1 AL2p-47 повышает уровни РНК или белка CSF1R в плазме.

[0253] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, описанных в данном документе, причем способ включает стадию измерения уровня CSF1R в образце, взятом у индивида. Образец может быть взят из крови спинномозговой жидкости индивида. Уровень РНК CSF1R или уровень белка CSF1R можно измерить любым способом, известным специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень CSF1R измеряют до и после введения антитела к TREM2 и рассчитывают разницу в уровне CSF1R. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 считается активным у индивида, если уровень CSF1R повышается после введения антитела к TREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 считается неактивным у индивида, если уровень CSF1R не повышается после введения антитела к TREM2.

[0254] Настоящее изобретение обеспечивает способ мониторинга лечения индивида, которому вводят антитело к TREM2, включающий измерение уровня CSF1R в образце от индивида до и после того, как индивид получил одну или более доз антитела к TREM2. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой мониторинг лечения индивида, которому вводят huIgG1 PSEG AL2p-58. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой мониторинг лечения индивида, которому вводят huIgG1 AL2p-47. В некоторых вариантах осуществления образец взят из спинномозговой жидкости индивида или крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию оценки активности антитела к TREM2 у индивида на основе уровня CSF1R в образце. Например, в некоторых вариантах реализации антитело к TREM2 считается активным у индивида, если уровень CSF1R повышается после введения антитела к TREM2, а в некоторых вариантах осуществления

антитело к TREM2 считается неактивным у человека, если уровень CSF1R не повышается после введения антитела к TREM2.

### **ПРИМЕРЫ**

#### **Пример 1: Жизнеспособность клеток макрофагов человека после удаления CSF1**

[0255] Чтобы оценить способность агонистического антитела к TREM2 поддерживать выживаемость макрофагов человека после удаления CSF1, моноциты человека были выделены из цельной крови с помощью протокола RosetteSep Human Monocyte Enrichment Protocol (Stem Cell Technologies). Для получения макрофагов, происходящих из моноцитов человека, моноциты подсчитывали и высевали в полную среду RPMI (RPMI с добавлением GlutaMax, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки) и 50 нг/мл M-CSF (PeproTech). Через 6 дней собирали дифференцированные моноциты (макрофаги) и высевали на 96-луночные планшеты с плотностью  $1,0 \times 10^5$  клеток/луночка в полной среде RPMI с M-CSF. Клетки оставляли для восстановления в течение ночи. На 7-й день клеточную среду заменяли бессывороточной средой RPMI и клетки обрабатывали только M-CSF (50 нг/мл), IgG1 (10 мкг/мл), AL2p-58 huIgG1 PSEG (1 мкг/мл), или huIgG1 PSEG AL2p-58 (10 мкг/мл). Жизнеспособность клеток определяли количественно с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo (Promega) на каждый последующий день после удаления M-CSF.

[0256] Как показано на **Фиг. 1** макрофаги человека, обработанные huIgG1 PSEG AL2p-58 (10 мкг/мл), имели значительно повышенную жизнеспособность клеток по сравнению с клетками, обработанными только M-CSF (50 нг/мл), IgG1 (10 мкг/мл) или huIgG1 PSEG AL2p-58 (1 мкг/мл). В частности, обработка huIgG1 PSEG AL2p-58 в дозе 10 мкг/мл значительно улучшала жизнеспособность клеток по сравнению с только M-CSF.

#### **Пример 2. Жизнеспособность и выживаемость макрофагов человека после ингибирования CSF1R**

[0257] Результаты, представленные в примере 1, продемонстрировали, что лечение агонистическим антителом к TREM2 может поддерживать выживаемость макрофагов человека после удаления M-CSF1. Однако M-CSF1 является только одним лигандом рецептора CSF1R. В данном примере были проведены эксперименты для изучения влияния агонистического антитела к TREM2 на жизнеспособность макрофагов человека при ингибировании самого рецептора CSF1R.

[0258] Чтобы оценить способность антитела к TREM2 поддерживать выживаемость макрофагов человека после ингибирования CSF1R, была протестирована способность huIgG1 PSEG AL2p-58 повышать жизнеспособность и выживаемость клеток в присутствии ингибитора CSF1R PLX3397 (DeNardo et al., Cancer Discov (2011) 1(1):54-67. 22039576); Peng, et al., J. of Exp Canc Res (2019) 38(1):372. PMID: 31438996). Подобно экспериментам с удалением CSF1, макрофаги человеческого происхождения высевали на 96-луночные планшеты на 6-й день и обрабатывали IgG1, PLX3397 (30 нМ), huIgG1 PSEG

AL2p-58 (10 мкг/мл) или комбинацией PLX3397 и huIgG1 PSEG AL2p-58 на 7-й день, все в полных средах RPMI. Жизнеспособность клеток определяли количественно с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности CellTiter-Glo (Promega) на каждый последующий день.

[0259] Как показано на **Фиг. 2**, обработка huIgG1 PSEG AL2p-58 поддерживала выживаемость макрофагов человека при ингибировании CSF1R. В частности, данные, представленные на **Фиг. 2**, продемонстрировали, что у макрофагов человека, обработанных PLX3397 (ингибитором CSF1R), снижается жизнеспособность клеток. Однако наблюдалось значительное улучшение жизнеспособности клеток, когда клетки, обработанные PLX3397, также обрабатывали huIgG1 PSEG AL2p-58. Кроме того, данные показали, что макрофаги человека, обработанные как PLX3397, так и huIgG1 PSEG AL2p-58, имели уровень жизнеспособности клеток, аналогичный уровню клеток, которые не подвергались ингибированию CSF1R (например, обработка только IgG1 или обработка только huIgG1 PSEG AL2p-58).

**Пример 3. Агонистическое антитело к TREM2 увеличивает экспрессию белка CSF1R у отличных от человека приматов.**

[0260] Отличных от человека приматов лечили контрольным IgG или повышающими концентрациями антитела huIgG1 PSEG AL2p-58. Измеряли уровень белка CSF1R в образцах фронтального кортекса. Как показано на **Фиг. 3**, обработка huIgG1 PSEG AL2p-58 увеличивала экспрессию белка CSF1R во фронтальном кортексе по сравнению с контрольной обработкой. Самая высокая концентрация huIgG1 PSEG AL2p-58, которая была в 12,5 раз выше, чем самая низкая концентрация huIgG1 PSEG AL2p-58, использованная в исследовании, привела к увеличению уровней CSF1R, которое было статистически значимым по сравнению с контролем, как было отмечено. По сравнению с фронтальным кортексом, увеличение CSF1R в гиппокампе наблюдалось, но не постоянно, у отличных от человека приматов, получавших huIgG1 PSEG AL2p-58 в сопоставимом исследовании, что указывает на то, что huIgG1 PSEG AL2p-58 может оказывать большее влияние на уровни CSF1R в определенных частях мозга по сравнению с другими.

**Пример 4. Антитело к TREM2 увеличивает уровни CSF1R во фронтальном кортексе и гиппокампе отличных от человека приматов.**

[0261] В этом примере описаны результаты экспериментов, в которых оценивали влияние huIgG1 AL2p-58 на уровни белка CSF1R во фронтальном кортексе и в гиппокампе отличных от человека приматов (яванских макаков). huIgG1 AL2p-58 представляет собой вариант антитела к TREM2 huIgG1 PSEG AL2p-58, имеющего Fc, содержащий IgG1 дикого типа.

[0262] Яванским макакам еженедельно вводили дозы контрольного антитела или антитела к TREM2 huIgG1 AL2p-58 путем внутривенной инъекции, всего пять доз (N=5 на дозовую группу). Через сорок восемь часов после введения 5-й дозы ткань головного мозга собирали, а соответствующие лизаты анализировали на экспрессию белка CSF1R.

[0263] Как показано на **Фиг. 4**, уровни белка CSF1R во фронтальном кортексе и в

гиппокампе отличных от человека приматов значительно увеличились после введения антитела к TREM2 huIgG1 AL2p-58 по сравнению с контрольными животными.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики обусловленного дефицитом CSF1R заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с белком TREM2, причем антитело является агонистом и при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело усиливает одну или более активностей TREM2, индуцированных связыванием одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что антитело усиливает одну или более активностей TREM2, не блокируя связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2.

4. Способ по п. 2 или п. 3, отличающийся тем, что антитело усиливает связывание одного или более лигандов TREM2 с белком TREM2.

5. Способ по любому из пп. 3-4, отличающийся тем, что один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из следующего: клетки *E. coli*, апоптотические клетки, нуклеиновые кислоты, анионные липиды, анионные липиды, APOE, APOE2, APOE3, APOE4, анионный APOE, анионный APOE2, анионный APOE3, анионный APOE4, липидированный APOE, липидированный APOE2, липидированный APOE3, липидированный APOE4, цвиттерионные липиды, отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилсерин, сульфатиды, фосфатидилхолин, сфингомиелин, мембранные фосфолипиды, липидированные белки, протеолипиды, липидированные пептиды, липидированный бета-амилоидный пептид и любая их комбинация.

6. Способ по любому из пп. 2-5, отличающийся тем, что антитело усиливает одну или более активностей TREM2 в отсутствие кластеризации TREM2 на клеточной поверхности.

7. Способ по любому из пп. 2-5, отличающийся тем, что антитело усиливает одну или более активностей TREM2, индуцируя или сохраняя кластеризацию TREM2 на клеточной поверхности.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что белок TREM2 представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что белок TREM2 представляет собой белок дикого типа, встречающийся в природе вариант или связанный с заболеванием вариант.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что одна или более активностей TREM2, которые индуцируются или усиливаются антителом, выбраны из группы, состоящей из следующего:

связывание TREM2 с DAP12;

фосфорилирование DAP12;

активация киназы Syk;

модулирование одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из

группы, состоящей из IFN- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CRP, CD86, MCP-1/CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCR2, CXCL-10, Gata3, члены семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, CSF-1, OPN, CD11c, GM-CSF, IL-11, IL -12, IL-17, IL-18 и IL-23, необязательно при этом модулирование происходит в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера и микроглиальных клеток;

рекрутирование Syk в комплекс DAP12/TREM2;

повышение активности одного или более TREM2-зависимых генов, необязательно при этом один или более TREM2-зависимых генов содержат факторы транскрипции семейства факторов транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT);

повышенная выживаемость дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса в коже, клеток Купфера, микроглии, микроглии M1, активированной микроглии M1 и микроглии M2 или любой их комбинации;

модулированная экспрессия одной или более стимулирующих молекул, выбранных из группы, состоящей из CD83, CD86 MHC класса II, CD40, и любой их комбинации, необязательно при этом CD40 экспрессируется на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах или любой их комбинации, и необязательно при этом дендритные клетки включают дендритные клетки костного мозга;

улучшение памяти; и

уменьшение когнитивного дефицита.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанное антитело способствует выживаемости макрофагов, культивируемых в отсутствие CSF1.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что антитело снижает уровни растворимого TREM2 в плазме *in vivo*.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что антитело блокирует расщепление TREM2.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что антитело индуцирует экспрессию CSF1R или повышает уровни CSF1R у индивида по сравнению с индивидом, не получавшего лечение, или индивидом, получавшего контрольное антитело.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что в головном мозге индивида происходит индукция экспрессии CSF1R или повышение уровня CSF1R.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что способ включает стадию измерения уровня CSF1R в образце, взятом у индивида.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что антитело представляет собой мышинное антитело, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, поливалентное антитело, конъюгированное антитело или химерное антитело.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 124-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 124-153 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 129-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 129-153 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 140-149 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-149 SEQ ID NO: 1; в пределах аминокислотных остатков 149-157 SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 149-157 SEQ ID NO: 1; или в пределах аминокислотных остатков 153-162 SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков в белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 153-162 SEQ ID NO: 1.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156 и H157 SEQ ID NO: 1, или одним или более аминокислотными остатками в белке TREM2 млекопитающих, соответствующих аминокислотному остатку, выбранному из группы, состоящей из D140, L141, W142, F143, P144, E151, D152, H154, E156, и H157 SEQ ID NO: 1.

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем HVR-H1 включает аминокислотную последовательность YAFSSQWMN (SEQ ID NO: 34), HVR-H2 включает аминокислотную последовательность RIYPGGGDTNYAGKFQG (SEQ ID NO: 35), HVR-H3 включает аминокислотную последовательность ARLLRNQPGESYAMDY (SEQ ID NO: 31), HVR-L1 включает аминокислотную последовательность RSSQSLVHSNRYTYLH (SEQ ID NO: 41), HVR-L2 включает аминокислотную последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO: 33), а HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SQSTRVPYT (SEQ ID NO: 32).

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30

23. Способ по любому из пп. 1-20 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем HVR-H1 включает аминокислотную последовательность YAFSSDWMN (SEQ ID NO: 36), HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность RIYPGEGDTNYARKFHG (SEQ ID NO: 37), HVR-H3 включает аминокислотную последовательность ARLLRNKPGESYAMDY (SEQ ID NO: 38), HVR-L1 включает аминокислотную последовательность RTSQSLVHSNAYTYLH (SEQ ID NO: 39), HVR-L2 включает аминокислотную последовательность KVSNRVS

(SEQ ID NO: 40), а HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SQSTRVPYТ (SEQ ID NO: 32).

24. Способ по любому из пп. 1-20 или 23, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29

25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что антитело представляет собой фрагмент, а фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv.

26. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело имеет изотип IgG1 человека и содержит аминокислотные замены в области Fc в положениях остатков P331S и E430G, при этом нумерация остатков соответствует нумерации EU.

29. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что антитело содержит:  
тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; или  
тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

30. Способ по любому из пп. 1-20 или 23-24, отличающийся тем, что антитело содержит:

тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или  
тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека.

32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой лейкоэнцефалопатию с дебютом во взрослом возрасте с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP).

33. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что обусловленное дефицитом CSF1R заболевание представляет собой лейкоэнцефалопатию с дебютом в детском возрасте.

34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что у индивида имеется мутация в гене CSF1R.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что мутация находится в части гена CSFR1, кодирующей внутриклеточный домен протеинтирозинкиназы.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что мутация находится в любом из экзонов



11-21 гена CSFR1.

37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что индивид является гетерозиготным по мутации в гене CSFR1.

38. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что индивид является гомозиготным по мутации в гене CSFR1.

39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что индивид имеет или подвергается риску развития заболевания, выбранного из группы, состоящей из лейкоэнцефалопатии, повреждения аксонов, аксональных сфероидов, повреждения миелина, потери миелиновых оболочек, глиоза, аутофлуоресцентных макрофагов, нагруженных липидами, и разрушения аксонов.

40. Способ по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что индивид имеет или подвергается риску развития симптома, выбранного из группы, состоящей из аномалии белого вещества головного мозга, изменений поведения, деменции, паркинсонизма, судорог, моторной афазии, аграфии, акалькулии, апраксии, брадикинезии, замедленных движений, демиелинизации ЦНС, депрессивности, депрессии, лобной деменции, глиоза, гиперрефлексии, повышенных рефлексов, подошвенного разгибательного рефлекса, гемипареза, квадрипареза, лейкоэнцефалопатии, нарушения памяти, забывчивости, потери памяти, проблем с памятью, плохой памяти, мутацизма, неспособности к активной речи, немоты, потери нейронов в центральной нервной системе, потери клеток головного мозга, постуральной неустойчивости, нарушения равновесия, быстрого прогрессирования, ригидности, мышечной ригидности, шарканья, шаркающей походки, пирамидных симптомов, спастичности, непроизвольной ригидности мышц, непроизвольного сокращения мышц, непроизвольных мышечных спазмов, личностных проблем, центральной дисфункции.

41. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что индивид имеет заболевание, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции (FTD), кортико-базального синдрома (CBS), кортико-базальной дегенерации (CBD), болезни Альцгеймера (AD), рассеянного склероза (MS), атипичной церебральной аутосомно-доминантной артериопатии с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) и болезни Паркинсона (PD).

42. Способ мониторинга лечения индивида, которому вводят антитело к TREM2, включающий измерение уровня CSF1R в образце от индивида до и после того, как индивид получил одну или более доз антитела к TREM2.

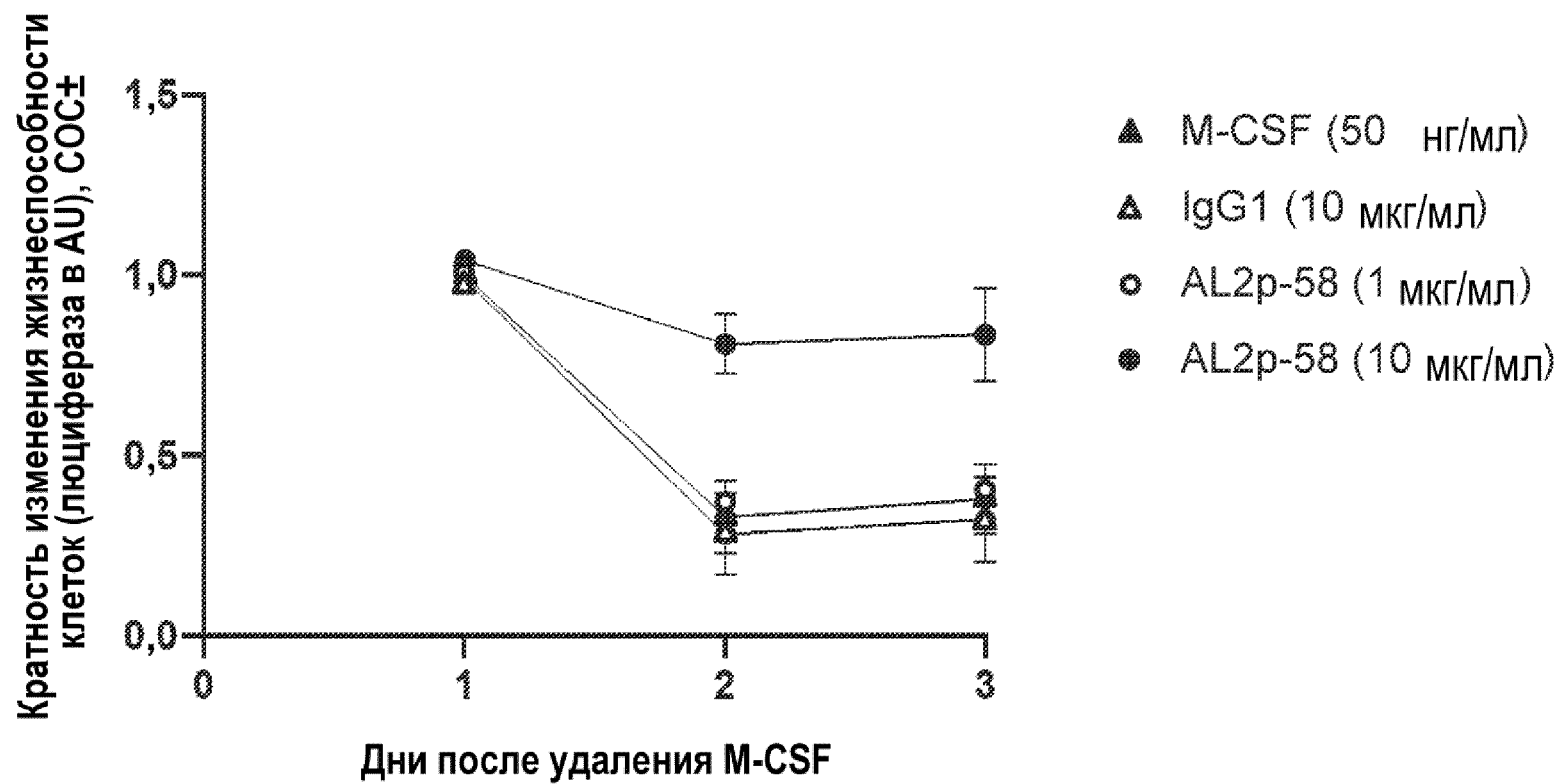
43. Способ по п. 42, дополнительно включающий стадию оценки активности антитела к TREM2 у индивида на основе уровня CSF1R в образце.

44. Способ по п. 42 или 43, отличающийся тем, что образец берут из спинномозговой жидкости индивида или крови индивида.

По доверенности

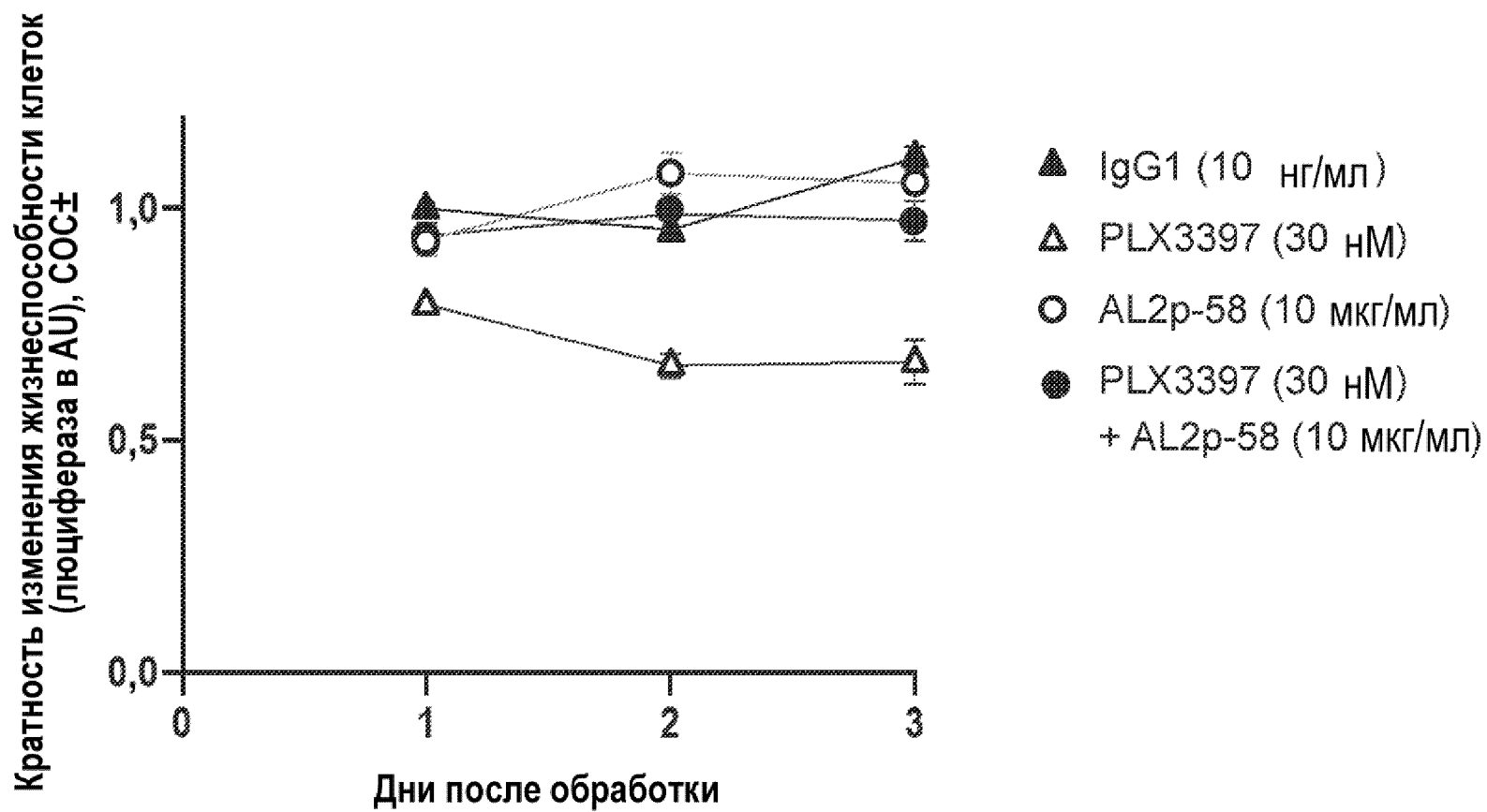
Фиг. 1

Кратность изменения (на Донора)

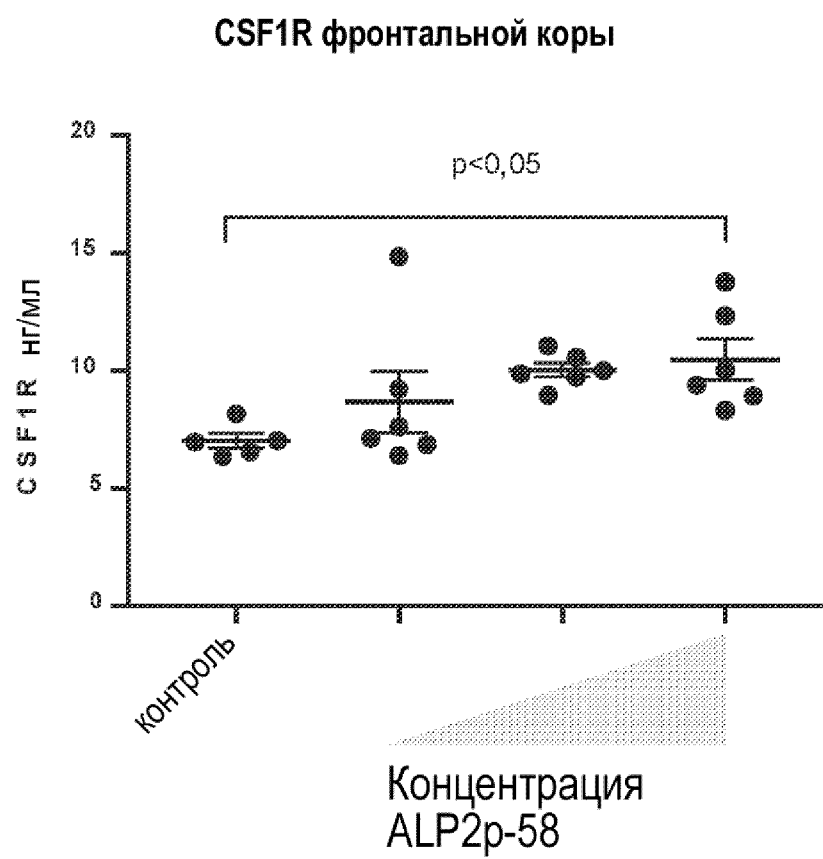


Фиг. 2

Кратность изменения – на Донора



Фиг. 3



Фиг. 4

