

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042890**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)

(21) Номер заявки
201790342

(22) Дата подачи заявки
2015.08.08

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

(31) **62/035,336; 62/135,110; 62/135,122**

(32) **2014.08.08; 2015.03.18; 2015.03.18**

(33) **US**

(43) **2017.07.31**

(86) **PCT/US2015/044396**

(87) **WO 2016/023019 2016.02.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛЕКТОР ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
**Монро Кейт, Швабе Тина, Авогадри-
Коннорс Франческа, Тасси Илария,
Лам Хелен, Розенталь Арнон (US)**

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

(56) **US-A1-20130150559**

Zhao et al. "Regulation of TREM2 expression by an NF-kB-sensitive miRNA-34a", Neuroreport, 2013 April 17; 24(6): 318-323; pg 3, para 3

TREM-2 (B-3): sc 373828 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) [incorporated by Zhao, 2013] [retrieved on 10 May 2016 from <http://datasheet.scbt.com/sc-373828.pdf>], SOURCE

(57) Изобретение в целом относится к способам и композициям, которые включают антитела, например моноклональные, химерные, гуманизированные антитела, фрагменты антител и т.п., которые специфически связываются с белком TREM2, например TREM2 млекопитающего и/или TREM2 человека. Представленные в данном документе способы находят применение в предотвращении, уменьшении риска или лечении индивидуума с деменцией, лобно-височной деменцией, болезнью Альцгеймера, болезнью Насу-Хакола или множественным склерозом.

B1

042890

042890

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке заявляется приоритет на предварительную заявку на патент США № 62/035336, поданную 8 августа 2014 года, предварительную заявку на патент США № 62/135110, поданную 18 марта 2015 года и предварительную заявку на патент США № 62/135122, поданную 18 марта 2015 года, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Представление списка последовательностей в текстовом файле формата ASCII.

Содержание следующего представления в текстовом файле формата ASCII включено в данном документе посредством ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 735022000440SEQLISTING.TXT, дата регистрации: 7 августа 2015 года, размер: 240 кБ).

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам к TREM2 и к DAP12 и терапевтическому применению таких антител.

Область техники

Триггерный рецептор, который экспрессируется на миелоидных клетках-2 (TREM2), представляет собой иммуноглобулин-подобный рецептор, который экспрессируется в основном на клетках миелоидного ряда, таких как макрофаги, дендритные клетки, моноциты, клетки Лангерганса кожи, клетки Купфера, остеокласты и микроглия; и является необходимым для модуляции (например, супрессии) сигнального пути Толл-подобного рецептора (TLR), модуляции воспалительных цитокинов, а также для нормального развития остеокластов. TREM2 был обнаружен как член трансмембранных гликопротеинов TREM, которые принадлежат к семейству рецепторов иммуноглобулинов с одиночным варибельным доменом (IgV). Гены, кодирующие человеческий и мышинный TREMs картированы на 6p21.1 хромосоме человека и 17C3 хромосоме мыши, соответственно. Кластер TREM включает гены, кодирующие TREM1, TREM2, TREM4 и TREM5, а также TREM-подобные гены у человека и мыши. Дополнительно у мышей были идентифицированы TERM3 и плазмочитоидная дендритная клетка (pДК)-TREM. TREM-подобные гены, TREML1 и TREML2 у людей и Trem11 и Trem12 у мыши, кодируют TLT-1 и TLT-2, соответственно. Два наиболее охарактеризованных из этих рецепторов, TREM1 и TREM2, показывают некоторую гомологию последовательности с другими членами Ig-SF, такими как рецепторы, активирующие NK-клетки (20% идентичности с NKp44), и действуют через ассоциацию с DAP12-опосредованным путем для передачи сигналов.

TREM2 первоначально был клонирован в виде кДНК, кодирующей гомолог TREM1 (Bouchon A. et al., J. Exp. Med., 2001. 194(8): p. 1111-22). Этот рецептор представляет собой гликопротеин около 40 кДа, который уменьшается до 26 кДа после N-дегликозилирования. Ген TREM2 кодирует белок длиной в 230 аминокислот, который содержит внеклеточный домен, трансмембранную область и короткую цитоплазматическую хвостовую часть. Внеклеточная область, кодируемая экзоном 2, состоит из домена Ig-SF одного типа V, содержащего три потенциальных сайта N-гликозилирования. Предполагаемая трансмембранная область содержит заряженный остаток лизина. Цитоплазматическая хвостовая часть TREM2 утратила сигнальные мотивы и предположительно передает сигнал через адаптерную молекулу сигналинга DAP12/TRYROBP.

Адаптерная молекула сигналинга DAP12 экспрессируется в виде гомодимера на поверхности множества клеток, участвующих во врожденном иммунном ответе, включая микроглию, макрофаги, гранулоциты, NK клетки и дендритные клетки (ДК). DAP12 является членом семьи трансмембранного адаптерного белка типа I на основании гомологии с цепями CD3, ассоциированных с рецептором Т-клеток человека (TCR), и γ -цепью рецептора Fc (FcR) (Turnbull I.R. and Colonna M., Nat. Rev. Immunol., 2007. 7(2): p. 155-61). Эти белки имеют много структурных и функциональных характеристик, включая один или более ITAM мотивов в их цитоплазматическом домене, заряженный кислотный остаток в трансмембранной области (необходимый для взаимодействия с партнерской цепью), а также способность вовлекать протеины, содержащие Src гомологичный домен-2 (SH2), после фосфорилирования тирозина. ITAM мотив опосредует распространение сигнала через активацию ZAP70 или тирозинкиназы Syk. Обе киназы фосфорилируют несколько субстратов, таким образом, способствуя формированию сигнального комплекса, что приводит к клеточной активации. Интересно, что некоторые В-клетки и Т-клетки также экспрессируют DAP12 при воспалительных процессах. У людей подмножества $CD4^+CD28^-$ Т-клеток, $\alpha\beta TCR^+CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих этот белок, были описаны у больных, страдающих хроническими воспалительными заболеваниями, в контексте аутоиммунных Т-клеток (Schleinitz, N. et al., PLoS ONE, 4 (2009), p. e6264). Ввиду значительного уровня экспрессии DAP12 в перитонеальных макрофагах мышей считается, что этот белок экспрессируется в других связанных с макрофагами клетках, таких как остеокласты в костном мозге, клетки Купфера в печени, альвеолярные макрофаги легких, клетки Лангерганса кожи, и клетки микроглии в головном мозге (Takaki, R. et al., Immunol. Rev., 2006. 214: p. 118-29).

TREM2 был идентифицирован как экспрессируемый на поверхности происходящих от моноцитов дендритных клеток и в качестве мРНК транскрипта в RAW264 линии клеток макрофагов мыши

(Bouchon, A. et al., *J. Exp. Med.*, 2001. 194(8): p. 1111-22). Человеческий TREM2 был первым DAP12-ассоциированным рецептором, описанным на поверхности ДК. Исследования показали, что по сравнению с клетками дикого типа, экспрессия TREM2 на поверхности клетки снижена в DAP12-дефицитных дендритных клетках костного мозга (BMDCs) и в DAP12-дефицитных макрофагах (Ito, H. and Hamerman, J.A., *Eur. J. Immunol.* 42(1): p. 176-85; Hamerman, J.A. et al., *J. Immunol.*, 2006. 177(4): p. 2051-5; и Hamerman, J.A. et al., *Nat. Immunol.*, 2005. 6(6): p. 579-86). Это указывает на то, что образование комплекса TREM2/DAP12 необходимо для максимальной экспрессии TREM2 на поверхности клетки.

Недавние исследования также показали экспрессию TREM2 на поверхности клеток макрофагов, инфильтрованных из кровотока, также как и на макрофагах, активированных ИЛ-4 или ИЛ-13 (Turnbull, IR et al., *J. Immunol.*, 2006. 177(6): p. 3520-4). Однако экспрессия TREM2 не всегда обнаруживалась в других клеточных популяциях, таких как тканевые резидентные макрофаги, циркулирующие моноциты или соответствующие клетки-предшественники в костном мозге, что дает основание предполагать, что экспрессия TREM2 индуцируется не централизованно, а локально во время инфильтрации ткани или путем цитокин-опосредованной активации. Более того, также было замечено, что ИФН- γ и ЛПС уменьшают или иным способом прекращают экспрессию TREM2. Кроме того, недавно было сообщено, что TREM2 экспрессируется на высоком уровне на клетках микроглии и инфильтрированных макрофагах в центральной нервной системе во время экспериментального аутоиммунного энцефаломиелиита или болезни Альцгеймера (Piccio, L. et al., *Eur. J. Immunol.*, 2007. 37(5): p. 1290-301; и Wang, Y., *Cell*. 2015 Mar 12; 160(6):1061-71).

Было показано, что TREM2 сигнализирует через DAP12. В нисходящем направлении это приводит к активации семейства тирозинкиназы Syk/Zap70, ФИЗК и других внутриклеточных сигналов. Для миелоидных клеток сигналы TLR являются важными для активации, например, как в случае с ответной реакцией на инфекцию, а также играют ключевую роль при патологической воспалительной реакции, например, как в случае с макрофагами и дендритными клетками (Hamerman, J.A. et al., (2006) *J. Immunol.* 177: 2051-2055; Ito, H. et al., *Eur. J. Immunol.* 42: 176-185; Neumann, H. et al., (2007) *J. Neuroimmunol.* 184: 92-99; Takahashi, K. et al., (2005) *J. Exp. Med.* 201: 647-657; и Takahashi, K. et al., (2007) *PLoS Med* 4: e124). Считается, что дефицит TREM2 или DAP12 приводит к повышенному провоспалительному сигналингу. Влияние TREM2-дефицита *in vitro* было показано в контексте стимуляции типичными лигандами TLR, такими как ЛПС, CpG ДНК и зимозан. TREM2-дефицитные дендритные клетки показывают повышенное высвобождение ИЛ-12p70, ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10 в присутствии, но не в отсутствие стимуляции.

В нескольких недавних исследованиях были изучены внутриклеточные сигнальные события, вызванные активацией пути TREM2/DAP12. Например, считается, что TREM2 активирует сигнальные пути, участвующие в выживаемости клетки (например, протеинкиназа B-Akt), активации клетки и дифференциации (например, Syk, Erk1/2, PLC- γ , и др.), и в контроле актинового цитоскелета (например, Syk, Vav и др.) (Peng, Q. et al., *Sci Signal.* 3 (122): p. ra38; и Whittaker, G.C. et al., *J. Biol. Chem.* 285(5): p. 2976-85). После лигирования TREM2, в DAP12 тирозины ITAM фосфорилируются киназами семейства SRC, что приводит к вовлечению и активации киназы Syk и/или киназы ZAP70. У мыши Syk может быть преобладающей вовлеченной киназой, тогда как у людей обе Syk и ZAP70, по всей видимости, эффективно взаимодействуют с такими субъединицами, содержащими ITAM, связываясь с ними через свои тандемные домены SH2.

Исследования передачи сигналов TREM2 показали, что, подобно TREM1, TREM2-опосредованный сигналинг через DAP12 также приводит к повышению уровней внутриклеточных ионов кальция и ERK1/2 фосфорилированию ERK1/2 (Bouchon, A. et al., *J. Exp. Med.*, 2001. 194(8): p. 1111-22; и Sharif, O. and Knapp, S., *Immunobiology*, 2008. 213(9-10): p. 701-13). Важным является то, что лигирование рецептора TREM2 не вызывает деградацию I κ B- α и последующую ядерную транслокацию NF- κ B, что указывает на возможную разницу между сигналами TREM2 и TREM1 (Bouchon, A. et al., *J. Exp. Med.*, 2001. 194(8): p. 1111-22). Перекрестное сшивание рецептора TREM2 на незрелых дендритных клетках запускает активацию молекул, участвующих в костимуляции Т-клеток, таких как CD86, CD40 и МНС класса II, а также активацию хемокинового рецептора CCR7 (Bouchon, A. et al., *J. Exp. Med.*, 2001. 194(8): p. 1111-22). TREM2 также экспрессируется на микроглии, где перекрестное сшивание рецепторов приводит к повышению фосфорилирования ERK1/2 и CCR7, но не к повышению экспрессии CD86 или МНС класса II, что указывает на возможные специфические для разных типов клеток различия в передаче сигналов TREM2. Дополнительно, сверхэкспрессия TREM2 в миелоидных клетках приводила к увеличению фагоцитоза дегенерированного миелина (Takahashi, K. et al., *PLoS Med*, 2007. 4(4): p. e124; и Neumann, H. and Takahashi, K., *J. Neuroimmunol.*, 2007. 184(1-2): p. 92-9).

Также было показано, что макрофаги костного мозга (BMDM), в которых с помощью кшПНК были подавлены TREM2, демонстрируют повышенное выделение ФНО в ответ на лиганд TLR2/6 зимозан и лиганд TLR9 CpG по сравнению с контрольными клетками BMDM, которые были обработаны неспецифической кшПНК, что указывает на то, что TREM2 отрицательно регулирует синтез цитокинов в макрофагах (Ito, H. and Hamerman, J.A., *Eur. J. Immunol.* 42(1): p. 176-85; Hamerman, J.A. et al., *J. Immunol.*,

2006. 177(4): p. 2051-5; и Hamerman, J.A. et al., *Nat. Immunol.*, 2005. 6(6): p. 579-86). Эти результаты были подтверждены с помощью клеток BMDM от нокаутных мышей по гену TREM2 и дополнительно показали, что по сравнению с клетками BMDM дикого типа, уровни ФНО и ИЛ-6 в ответ на ЛПС были также выше в TREM2^{-/-} клетках BMDM (Turnbull, I.R., et al., *J. Immunol.*, 2006. 177(6): p. 3520-4; и Turnbull, I.R. and Colonna, M., *Nat. Rev. Immunol.*, 2007. 7(2): p. 155-61). Дополнительно, было продемонстрировано, что сверхэкспрессия TREM2 в микроглии приводит к снижению мРНК ФНО и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) после культивирования этих клеток с апоптозными нейронами, тогда как нокадаун TREM2 приводит к умеренному повышению уровней мРНК ФНО и iNOS. Это указывает на то, что в отличие от TREM1, который является положительным регулятором синтеза цитокинов, TREM2 является отрицательным регулятором синтеза цитокинов. Этот эффект TREM2 на воспаление может быть независимым от типа макрофага, как это происходит в клетках микроглии и BMDM.

Было также показано, что в резидентных миелиоидных клетках центральной нервной системы активация микроглии может привести к воспалению (Neumann, H. et al., (2007) *J. Neuroimmunol.* 184: 92-99; Takahashi, K. et al., (2005) *J. Exp. Med.* 201: 647-657; Takahashi, K. et al., (2007) *PLoS Med.* 4: e124; и Hsieh, C.L. et al., (2009) *J. Neurochem.* 109: 1144-1156). Более того, активация микроглии также наблюдалась при лобно-височной деменции (ЛВД), болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, инсульте/ишемическом повреждении головного мозга и рассеянном склерозе. В то время как снижение активации TREM2 приводит к увеличению некоторых маркеров активации и воспаления, таких как транскрипция гена NOS2 в миелиоидных клетках, повышение активации TREM2 приводит к понижению транскрипции NOS2. Считается, что умирающие нейроны экспрессируют эндогенный лиганд для TREM2. HSP60 был вовлечен в качестве лиганда TREM2 на клетках нейроblastомы (Stefani, L. et al., (2009) *Neurochem* 110: 284-294). Сверхэкспрессия TREM2 также приводит к повышению фагоцитоза умирающих нейронов клетками микроглии и аналогичным образом повышает фагоцитоз другими клетками миелиоидного ряда.

Было показано, что у людей полное отсутствие TREM2 вызывает болезнь Насу-Хакола, редкое нейродегенеративное заболевание с поздним началом деменции, демиелинизации и атрофии головного мозга (Paloneva, J. et al., (2002) *Am. J. Hum. Genet.* 71: 656-662; и Paloneva, J. et al., (2003) *J. Exp. Med.* 198: 669-675). Болезнь Насу-Хакола также может быть вызвана дефицитом DAP12.

Также было показано, что экспрессия гена TREM2 повышена у трансгенных мышей APP23, модели болезни Альцгеймера, в которой мыши экспрессируют мутантную форму белка-предшественника амилоида, который связан с семейной болезнью Альцгеймера (Melchior, B. et al., *ASN Neuro* 2: e00037). Также было показано, что поглощение амилоида 1-42 увеличивается в линиях клеток микроглии BV-2, которые сверхэкспрессируют TREM2.

Дополнительно была показана повышенная экспрессия TREM2 на мышечной модели рассеянного склероза EAE (Neumann, H. et al., (2007) *J. Neuroimmunol.* 184: 92-99; Takahashi, K. et al., (2005) *J. Exp. Med.* 201: 647-657; и Takahashi, K. et al., (2007) *PLoS Med.* 4: e124). Трансдукция миелиоидных клеток-предшественников из костного мозга (BM-DC) *in vitro* с TREM2 приводит к усиленному фагоцитозу дегенерированного миелина. В ответ на ЛПС эти клетки демонстрируют повышение уровня ИЛ-10 и снижение уровня ИЛ-1β. Внутривенная трансплантация миелиоидных клеток с избыточной экспрессией TREM2 может подавлять EAE *in vivo*.

Дополнительно, секвенирование экзона индивидуумов с описанной лобно-височной деменцией (ЛВД) выявило гомозиготные мутации в TREM2 (Guerreiro, R.J. et al., *JAMA Neurol.* 70: 78-84; и Guerreiro, R.J. et al., *Arch Neurol.* 1-7). Некоторые из этих мутаций приводят к усечению и, вероятно, потере функции TREM2. Эти же мутации TREM2 также могут вызывать болезнь Наку-Хакула у некоторых индивидуумов. Анализ изображений у некоторых индивидуумов с гомозиготными мутациями TREM2 также показал признаки демиелинизации.

Гетерозиготные мутации в TREM2, которые являются такими же, как и мутация, вызывающая болезнь Наку-Хакула и ЛВД, тоже увеличивают риск возникновения болезни Альцгеймера (Guerreiro, R. et al., *N. Engl. J. Med.* 368: 117-127; Jonsson, T. et al., *N. Engl. J. Med.* 368: 107-116; и Neumann, H. et al., *N. Engl. J. Med.* 368: 182-184). Не смотря на то что эти мутации TREM2 встречаются реже, чем известные варианты, связанные с риском возникновения болезни Альцгеймера (например, APOE4), эффект наличия этих мутаций столь же серьезен; примерно в 3 раза увеличивает риск развития болезни Альцгеймера. Более того, даже у индивидуумов без болезни Альцгеймера, несущих гетерозиготную мутацию TREM2, наблюдается худшая когнитивная деятельность по сравнению с индивидуумами с двумя нормальными аллелями TREM2. Дополнительно, было показано, что вариант R47H TREM2 (аминокислотная замена аргинина на гистидин в положении 47 в TREM2), который является наиболее распространенной мутацией TREM2 (до 1 из 200 индивидуумов), располагается в иммуноглобулиновом домене TREM2 и, таким образом, может изменять связывание лиганда (Wang Y., *Cell.* 2015 Mar 12; 160 (6): 1061-71).

Дополнительно, интегративный сетевой подход к упорядоченной по рангам структуре молекулярных сетей экспрессии генов, релевантной для развития болезни Альцгеймера с поздним началом (LOAD), идентифицировал в качестве сигнальной молекулы для TREM2 TYROBP/DAP12 как ключевой регулятор иммунных/микроглиальных генных модулей, которые ассоциированы с LOAD. Было обнаружено, что TYROBP является причинным регулятором иммунного/микроглиального модуля с наивысшей

количественной оценкой как упорядоченного по рангам на основе количества других генов, регулируемых TREM2, и величины потери регуляции, а также дифференциальной экспрессии в мозгах с LOAD. Уровень TYROBP значительно повышался в мозгах с LOAD и наблюдалось прогрессирующее изменение экспрессии TYROBP при умеренных когнитивных нарушениях (MCI), которые часто предшествуют LOAD (Zhang et al., (2013) Cell 153, 707-720). Ориентация таких причинно-следственных сетей способами, которые восстанавливают их до нормального состояния, может являться способом лечения заболевания.

Соответственно, существует потребность в антителах, которые специфически связывают TREM2 и/или его адаптерную молекулу сигнала DAP12/TYROBP на поверхности клетки, и которые модулируют (например, активируют или ингибируют) одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 для лечения одного или более заболеваний, расстройств и состояний, связанных со сниженной активностью TREM2 и/или DAP12, а также состояний, ассоциированных с нежелательной активностью TREM2 и/или DAP12.

Более того, микроокружение опухоли состоит из гетерогенного иммунного инфильтрата, который включает в себя Т-лимфоциты, макрофаги и клетки миелоидного/гранулоцитарного ряда.

Терапевтические подходы, которые модулируют определенные подтипы иммунных клеток, меняют стандарт лечения. Антитела, "блокирующие контрольную точку", нацеленные на модулирующие иммунную систему молекулы, экспрессируемые на Т-клетках (такие как CTLA-4 и PD-1), продемонстрировали клиническую активность во множестве типов опухолей (Naidoo et al., (2014) British Journal of Cancer 111, 2214-2219).

Иммунотерапия рака, нацеленная на ассоциированные с опухолью макрофаги (например, макрофаги M2-типа), является областью интенсивных исследований. Наличие макрофагов M2 в опухолях связано с плохим прогнозом. Соответственно, существует потребность в антителах, которые специфически связывают TREM2 и/или DAP12 и модулируют (например, активируют или ингибируют) одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 в клетках иммунной системы, ассоциированных с опухолью, таких как макрофаги, дендритные клетки, миелоидные/гранулоцитарные клетки, Т-клетки и моноциты.

Все цитируемые в данном документе ссылки, включая заявки на патенты и публикации, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Сущность изобретения

Изобретение в целом относится к способам и композициям, которые включают антитела, например моноклональные антитела, химерные антитела, биспецифические антитела, гуманизированные антитела, фрагменты антител, и тому подобное, которые специфически связываются с белком TREM2 и/или его адаптерной молекулой сигналинга DAP12, например TREM2 млекопитающего, TREM2 человека, DAP12 млекопитающего или DAP12 человека, в том числе с белками дикого типа и их вариантами естественного происхождения. Антитела согласно настоящему описанию могут включать агонистические антитела, инертные антитела и/или антагонистические антитела. Представленные в данном документе способы находят применение в предотвращении, уменьшении риска или лечении индивидуума с деменцией, лобно-височной деменцией, болезнью Альцгеймера, болезнью Насу-Хакола или множественным склерозом; в индукции или содействии выживаемости клеток врожденной иммунной системы у человека, нуждающегося в этом и/или в снижении выживаемости клеток врожденной иммунной системы у человека, нуждающегося в этом.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к различным классам антител к TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 представляют собой агонистические антитела, которые связываются с TREM2 и активируют, индуцируют, содействуют, стимулируют или, иным образом, повышают одну или более активностей TREM2, выживаемость одной или более клеток врожденной иммунной системы и/или экспрессию ИЛ-6. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистические антитела к TREM2 по данному описанию конкурируют с лигандами TREM2 для связывания с TREM2, экспрессированным на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистические антитела к TREM2 по данному описанию не конкурируют с лигандами TREM2 для связывания с TREM2, экспрессированными на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 представляют собой инертные антитела или антитела-антагонисты, которые связываются с TREM2 и снижают, ингибируют или, иным образом, уменьшают одну или более активностей TREM2 и/или выживаемость одной или более клеток врожденной иммунной системы. В некоторых вариантах реализации изобретения инертные антитела или антитела-антагонисты к TREM2 по данному описанию блокируют или, иным способом, ингибируют связывание лиганда с TREM2, экспрессированным на поверхности клетки.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному агонистическому антителу, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками, при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обеих активностей.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой белок млекопитающего или белок человека. В определенных вариантах реализации

изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой белок дикого типа. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой встречающийся в природе вариант. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой экспрессируется на дендритных клетках человека, макрофагах человека, моноцитах человека, остеокластах человека, клетках Лангерганса кожи человека, купферовых клетках человека и/или клетках микроглии человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2, кластеризацию DAP12 или кластеризацию и того и другого на поверхности клетки. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2 включает связывание TREM2 с DAP12. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей DAP12 включает связывание DAP12 с TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают фосфорилирование DAP12, фосфорилирование TREM2 или и то и другое. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, фосфорилирование DAP12, фосфорилирование TREM2 или и то и другое индуцируется одним или более SRC-семейством тирозинкиназ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одно или более SRC-семейство тирозинкиназ содержит киназу Syk. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают активацию ФИЗК. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают повышенную экспрессию одного или более провоспалительных цитокинов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают повышенную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов (например, цитокинов), выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, повышенная экспрессия возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных цитокинов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ-1β, ФНО, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженную экспрессию ФНО-α, ИЛ-6 или и того и другого. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, пониженная экспрессия одного или более провоспалительных медиаторов возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают повышенную экспрессию С-С рецептора хемокина 7 (CCR7). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей

TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают усиление, нормализацию, или обе способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают индукцию продуцирования остеокластов, увеличение уровня остеокластогенеза или и то и другое. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают увеличение выживаемости макрофагов, клеток микроглии или и того и другого. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают увеличение функции макрофагов, клеток микроглии, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, и/или клеток Купфера. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, макрофаги представляют собой макрофаги M1 и/или микроглию, макрофаги M2 и/или микроглию, или и те, и те. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, макрофаги M1 и/или микроглия представляют собой активированные макрофаги M1 и/или микроглию. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дебриса нервной ткани, клиренса дебриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворного белка, клиренса болезнетворного пептида и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают индукцию фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, болезнетворный белок выбран из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида А, медиана, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератозепителлина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, болезнетворная нуклеиновая кислота представляет собой бессмысловую РНК экспансии повторов GGCCCC (G2C4). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают нормализацию нарушенной экспрессии генов, которая зависит от TREM2/DAP12. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают вовлечение Syk, ZAP70, или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают фосфорилирование Syk. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, макрофагах и/или моноцитах. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженное выделение одного или более воспалительных цитокинов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одни или более воспалительных цитокинов выбраны из группы, состоящей из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-1 β , ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемо-

кинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, один или более воспалительных рецепторов включают CD86. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают увеличение фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают снижение фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают повышение активности одного или более TREM2-зависимых генов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, один или более TREM2-зависимых генов включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, независимо от связывания с Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIB (FcγRIIB). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область, которая содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG1 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIB (FcγRIIB). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшеств-

вующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константный домен 1 (CH1) тяжелой цепи изотипа IgG2 и шарнирную область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, CH1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержит аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS

WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS

NTKVDKTVRKCCVCEPPCP (SEQ ID NO: 397).

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F, или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков на IgG1 представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG4 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIb (FcγIIb). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет гибридный изотип IgG2/4. В определенных вариантах реализации изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 мыши. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека, и встречающегося в природе варианта DAP12 человека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному неактивному антителу, которое связывается с белком TREM2. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антагани-

стическому антителу, которое связывается с белком TREM2.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой белок млекопитающего или белок человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой белок дикого типа. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, белок TREM2, белок DAP12 или и тот, и другой представляет собой встречающийся в природе вариант. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12, или обе активности. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают снижение активности одного или более TREM2-зависимых генов. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, один или более TREM2-зависимых генов включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных T-клеток (NFAT). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают снижение выживаемости макрофагов, клеток микроглии, макрофагов M1, клеток микроглии M1, макрофагов M2, клеток микроглии M2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG1 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов

реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG4 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело конкурирует за связывание TREM2 с одним или более лигандами TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из клеток E.coli, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерионных липидов, отрицательно заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и липидированного амилоидного бета пептида. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело, конъюгированное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, первый антиген представляет собой TREM2 человека или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет собой болезнетворный белок, выбранный из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Tau, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrP^{Sc}, хантинтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретаина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ПДП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR); белок, специфический по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, выбран из группы, состоящей из: рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1; или лигандов и/или белков, экспрессируемых на поверхности иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело пред-

ставляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека; и причем антитело используется в комбинации с одним или более антителами, которые специфически связываются с болезнетворным белком, выбранным из группы, состоящей из: бета-амилоида или его фрагментов, Tau, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrP^{sc}, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактинина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR), и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с линейным эпитопом на TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, линейный эпитоп на TREM2 находится в пределах внеклеточного домена TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, линейный эпитоп на TREM2 находится в пределах внеклеточного иммуноглобулинподобного домена варибельного типа (IgV) TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с белком TREM2, и причем выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: i. аминокислотных остатков 29-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-112 из SEQ ID NO: 1; ii. аминокислотных остатков 29-41 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-41 из SEQ ID NO: 1; iii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 40-44 из SEQ ID NO: 1; iv. аминокислотных остатков 47-69 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 47-69 из SEQ ID NO: 1; v. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 67-76 из SEQ ID NO: 1; vi. аминокислотных остатков 76-86 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 76-86 из SEQ ID NO: 1; vii. аминокислотных остатков 91-100 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 91-100 из SEQ ID NO: 1; viii. аминокислотных остатков 99-115 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 99-115 из SEQ ID NO: 1; ix. аминокислотных остатков 104-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 104-112 из SEQ ID NO: 1; и x. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 114-118 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: i. аминокислотных остатков Arg47 или Asp87 из SEQ ID NO: 1; ii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1; iii. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1; и iv. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предше-

щую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 403.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, в котором выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела Ат21; и/или в котором вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела Ат21. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 405. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409. В определенных вариантах реализации изобретения, выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, в котором вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 405, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406, и/или в котором вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409.

Другие аспекты описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, в котором выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит: (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 404; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 405 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 405; и/или (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 406; и/или в котором вариабельный домен легкой цепи содержит: (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 407; (b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 408; а также; и/или (c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 409.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат52. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат21.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой агонистическое антитело, и причем антитело индуцирует одну или несколько активностей TREM2, активностей DAP12, или обе активности. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2, кластеризацию DAP12 или кластеризацию и того и другого на поверхности клетки. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности выбраны из группы состоящей из связывания TREM2 с DAP12; связывания DAP12 с TREM2; фосфорилирования TREM2, фосфорилирования DAP12; активации ФИЗК; повышенной экспрессии одного или более противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов),

выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10; пониженной экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ-1β, ФНО, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ; пониженной экспрессии ФНО-α, ИЛ-6 или и того и другого; фосфорилирования киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK); повышенной экспрессии С-С рецептора хемокина 7 (CCR7); индукции хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличения, нормализации, или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукции продуцирования остеокластов, увеличения уровня остеокластогенеза или и того и другого; увеличения выживаемости и/или функции одной или более дендритных клеток, макрофагов, клеток микроглии, макрофагов и/или клеток микроглии М1, активированных макрофагов и/или клеток микроглии М1, макрофагов и/или клеток микроглии М2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера; индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дебриса нервной ткани, клиренса дебриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворного белка, клиренса болезнетворного пептида и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты; индукции фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворной нуклеиновой кислоты; нормализации нарушенной TREM2/DAP12-зависимой генной экспрессии; вовлечения Syk, ZAP70, или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; фосфорилирования Syk; повышенной экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, макрофагах, моноцитах и/или микроглии; пониженной секреции одного или более воспалительных цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-1β, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, LIF, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ; пониженной экспрессии одного или более воспалительных рецепторов; повышения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; понижения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ; повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов; и любых их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, независимо от связывания с Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым

из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG1 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константный домен 1 (СН1) тяжелой цепи изотипа IgG2 и шарнирную область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, СН1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSVHNTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS
NTKVDKTVRKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 397).

```

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E аминокислотную замену L328F, или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG4 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет гибридный изотип IgG2/4. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 мыши. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта

TREM2 человека, DAP12 человека, и встречающегося в природе варианта DAP12 человека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой инертное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из снижения активности одного или более TREM2-зависимых генов; снижения активности одного или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); снижения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток; и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR). В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG1 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения,

которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG4 человека содержит Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой антитело человека, гуманизованное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное антитело способствует выживаемости одной или более клеток врожденной иммунной системы. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное антитело повышает экспрессию ИЛ-6. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное антитело способствует выживаемости одной или более клеток врожденной иммунной системы или повышает экспрессию ИЛ-6. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное антитело способствует выживаемости одной или более клеток врожденной иммунной системы или повышает экспрессию ИЛ-6. В определенных вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы выбраны из группы, состоящей из макрофагов, клеток микроглии, клеток микроглии M1, активированных клеток микроглии M1, клеток микроглии M2, дендритных клеток, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются макрофагами. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются клетками микроглии. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются клетками микроглии M1. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются активированными клетками микроглии M1. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются клетками микроглии M2. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются дендритными клетками (ДК). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются макрофагами M1. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются активированными макрофагами M1. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более клеток врожденной иммунной системы являются макрофагами M2. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или

ляет собой встречающийся в природе вариант. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой агонистическое антитело, и причем антитело индуцирует одну или несколько активностей TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2 на поверхности клетки. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из: i. связывания TREM2 с DAP12; ii. фосфорилирования DAP12; iii. Повышения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, клеток микроглии M1, активированных клеток микроглии M1, клеток микроглии M2, дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера; iv. фосфорилирования Syk; v. повышения экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках; vi. повышения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией; vii. повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов, причем необязательно один или более TREM2-зависимых генов включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); и viii. повышения экспрессии одного или более медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело индуцирует одну или более активностей TREM2 независимо от связывания с Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγIIВ). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения: i. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; ii. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека, в котором IgG2 человека содержит константную область и в котором константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; iii. выделенное антитело имеет изотип IgG1 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; iv. выделенное антитело имеет изотип IgG1 и содержит константный домен 1 (CH1) тяжелой цепи изотипа IgG2 и шарнирную область, причем необязательно CH1 изотипа IgG2 и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS

WNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVT

VPSSNFGTQT

YTCNVDHKPS

NTKVDKTVERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 397),

и причем необязательно Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; v. выделенное антитело имеет изотип IgG4 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; или vi. выделенное антитело имеет гибридный изотип IgG2/4, причем необязательно антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остат-

ков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой инертное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более ингибированных активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из снижения активности одного или более TREM2-зависимых генов; снижения активности одного или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); снижения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, макрофагов M1, клеток микроглии M1, макрофагов M2, клеток микроглии M2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток; снижения экспрессии одного или более медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10; и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (Fc γ R). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения: i. выделенное антитело имеет изотип IgG1 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat, причем необязательно Fc-область дополнительно содержит делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU или Kabat; ii. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; или iii. выделенное антитело имеет изотип IgG4 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека и встречающегося в природе варианта TREM2 человека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, и причем фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или фрагмент scFv. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело конкурирует за связывание TREM2 с одним или более лигандами TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из клеток E.coli, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерных липидов, отрицательно

заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и липидированного амилоидного бета пептида. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультвалентное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, первый антиген представляет собой TREM2 человека или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет собой болезнетворный белок, выбранный из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактин, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR); или белок, специфический по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, выбранный из группы, состоящей из: рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека и встречающегося в природе варианта TREM2 человека; и причем антитело используется в комбинации с одним или более антителами, которые специфически связываются с болезнетворным белком, выбранным из группы, состоящей из: бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактин, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR), и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с TREM2 и DAP12.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит: (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24, 398 и 404; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49, 399 и 405; и (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119, 400 и 406; и/или причем вариабельный домен легкой цепи содержит: (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137, 401 и 407; (b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152, 402 и 408; и (c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236, 403 и 409.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, в котором выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит: (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24, 398 и 404; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49, 399 и 405; и (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119, 400 и 406; и/или причем вариабельный домен легкой цепи содержит: (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137, 401 и 407; (b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152, 402 и 408; и (c) HVR-L3, содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236, 403 и 409. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из: Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу к TREM2 человека, которое конкурирует с моноклональным антителом, выбранным из группы, состоящей из: Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87 за связывание с TREM2.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой агонистическое антитело, и причем антитело индуцирует одну или несколько активностей TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2 на поверхности клетки. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из связывания TREM2 с DAP12; фосфорилирования DAP12; повышения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, клеток микроглии M1, активированных клеток микроглии M1, клеток микроглии M2, дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера; повышения экспрессии ИЛ-6; фосфорилирования Syk; повышения экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках; повышения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией; и повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов, причем необязательно один или более TREM2-зависимых генов включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); и любых их комбинаций. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит константную область IgG2 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, константная область IgG2 человека содержит Fc-область. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело индуцирует одну или более активностей TREM2 независимо от связывания с Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIB (FcγIIB). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения: i. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; ii. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека, в котором IgG2 человека содержит константную область и в котором константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; iii. выделенное антитело имеет изотип IgG1 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; iv. выделенное антитело имеет изотип IgG1 и содержит константный домен

1 (СН1) тяжелой цепи изотипа IgG2 и шарнирную область, причем необязательно СН1 изотипа IgG2 и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS
WNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS
NTKVDKTVERKCCVECPCPP (SEQ ID NO: 397),

```

и причем необязательно Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; v. выделенное антитело имеет изотип IgG1 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; или vi. выделенное антитело имеет гибридный изотип IgG2/4, причем необязательно антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека и встречающегося в природе варианта TREM2 человека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, и причем фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или фрагмент scFv. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой инертное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, одна или более ингибированных активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из снижения активности одного или более TREM2-зависимых генов; снижения активности одного или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); снижения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток; снижения экспрессии одного или более медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10; и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR). В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения: i. выделенное антитело имеет изотип IgG1 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat, причем необязательно Fc-область дополнительно содержит делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU или Kabat; ii. выделенное антитело имеет изотип IgG2 человека и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat; или iii. Выделенное антитело имеет изотип IgG4 человека или мыши и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, кото-

рый связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека и встречающегося в природе варианта TREM2 человека. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, и причем фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или фрагмент scFv. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело представляет собой моноклональное антитело.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело специфически связывается как с TREM2 человека, так и с TREM2 мыши. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для TREM2 человека и TREM2 мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 5,75 нМ до менее чем около 0,09 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 1,51 нМ до менее чем около 0,35 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для мономерного белка TREM2 человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 5,75 нМ до менее чем около 1,15 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 0,23 нМ до менее чем около 0,09 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для TREM2 человека и TREM2 мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 6,70 нМ до менее чем около 0,23 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 0,71 нМ до менее чем около 0,23 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для мономерного белка TREM2 человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 6,70 нМ до менее чем около 0,66 нМ. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 4,90 нМ до менее чем около 0,35 нМ.

Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к клетке-хозяину, содержащей вектор по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенной клетке-хозяину, содержащей вектор по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к способу продуцирования антитела, содержащего культивирование клетки по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, в результате которого продуцируется антитело. В некоторых вариан-

тах реализации изобретения способ дополнительно включает выделение антитела, продуцируемого клеткой. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, полученному по любому из предшествующих способов получения антитела. Другие аспекты настоящего описания относятся к фармацевтической композиции, содержащей антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способу предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному агонистическому антителу по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения с целью применения для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза. Другие аспекты настоящего описания относятся к применению выделенного агонистического антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения в изготовлении лекарственного средства для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из: i. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1; ii. замены глутамина на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1; iii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1; iv. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1; v. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1; vi. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1; vii. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из: i. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2; ii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2; iii. делеции в пределах экзонов 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; iv. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и v. нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способу индуцирования или стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом, содержащему введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному агонистическому антителу по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, для применения в индуцировании или стимулировании выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом. Другие аспекты настоящего описания относятся к применению выделенного агонистического антитела по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, в изготовлении лекарственного средства для индуцирования или стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом. Другие аспекты настоящего описания относятся к способу индуцирования или стимулирования заживления ран индивидуума, нуждающегося в этом, содержащему введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела, которое связывается с белком TREM2. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному агонистическому антителу, которое связывается с белком TREM2,

для применения в индуцировании или стимулировании заживления ран индивидуума, нуждающегося в этом. Другие аспекты настоящего описания относятся к применению выделенного агонистического антитела, которое связывается с белком TREM2, в изготовлении лекарственного средства для индуцирования или стимулирования заживления ран индивидуума, нуждающегося в этом.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способу снижения выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом, содержащему введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антагонистического антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антагонистическому антителу по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, для применения в снижении выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом. Другие аспекты настоящего описания относятся к применению выделенного антагонистического антитела по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, в изготовлении лекарственного средства для снижения выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способу предупреждения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдром Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и рака, содержащему введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, с целью применения для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдром Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и рака. Другие аспекты настоящего описания относятся к применению выделенного антитела по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, в изготовлении лекарственного средства для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдром Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и

рака.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой: (a) агонистическое антитело; (b) инертное антитело; или (c) антагонистическое антитело. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, (a) антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA; и/или (b) антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, антитело содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области, находящихся в позиции остатка, выbranного из группы, состоящей из: (a) V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; (b) N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; (c) L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; (d) N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; (e) V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; или (f) E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело: (a) связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO: 1; или (b) одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело: (a) связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело At52; (b) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела At52; и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела At52; (c) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 398, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 398, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 399 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 399, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 400, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 400, и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 401 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 401, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 402 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 402, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 403; (d) связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело At21; (e) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела At21; и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела At21; или (f) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 404, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 405, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 405, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 406, и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 407, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408 или

аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 408, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 409. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное антитело представляет собой выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, выделенное агонистическое антитело представляет собой выделенное агонистическое антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из: i. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1; ii. замены глутамина на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1; iii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1; iv. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1; v. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1; vi. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1; vii. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из: i. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2; ii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2; iii. делеции в пределах экзона 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; iv. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и v. нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, рак является выбранным из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака мозга, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, рака почки, почечно-клеточного рака, лейкоза, рака легких, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, фибросаркомы и рака щитовидной железы. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, способ дополнительно содержит введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку, и/или другую стандартную или экспериментальную противораковую терапию. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольную точку, вводится в комбинации с выделенным антителом. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольную точку, является выбранным из группы, состоящей из антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к PD-L2, антитела к PD-1, антитела к B7-H3, антитела к B7-H4, антитела к HVEM, антитела к аттенуатору В- и Т-лимфоцитов (BTLA), антитела к рецептору подавления цитотоксичности (KIR), антитела KGAL9, антитела к TIM3, антитела к A2AR, антитела к LAG-3, антитела к фосфатидилсерину, антитела KCD27 и любой их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, стандартная или экспериментальная противораковая терапия представляет собой одну или более терапий, выбранных из группы, состоящей из радиотерапии, химиотерапии, целевой терапии, иматиниба (Gleevec®), трастузу-

маба (Herceptin®), адоптивного переноса клеток (АСТ), переноса химерного антигенного рецептора Т-клеток (CAR-T), вакцинотерапии и цитокиновой терапии. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, способ дополнительно содержит введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, вводится в комбинации с выделенным антителом. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином является выбранным из группы, состоящей из антитела КСCL2, антитела к КСФ-1, антитела к ИЛ-2 и любой их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, способ дополнительно содержит введение индивидууму по меньшей мере одного агонистического антитела, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком, вводится в комбинации с выделенным антителом. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком является выбранным из группы, состоящей из агонистического антитела к CD40, агонистического антитела к OX40, агонистического антитела к ICOS, агонистического антитела к CD28, агонистического антитела к CD137/4-1BB, агонистического антитела к CD27, агонистического антитела к глюкокортикоид-индуцированному TNFR-связанному белку GITR и любой их комбинации. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения, способ дополнительно содержит введение индивидууму по меньшей мере одного стимулирующего цитокина. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере один стимулирующий цитокин, вводится в комбинации с выделенным антителом. В определенных вариантах реализации изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов реализации изобретения по меньшей мере один стимулирующий цитокин, является выбранным из группы, состоящей из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-8, СРБ, ИФН- α , ИФН- β , ИЛ-2, ИЛ-18, ГМ-КСФ, Г-КСФ и любой их комбинации.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А проиллюстрировано выравнивание аминокислотной последовательности между белком TREM2 человека (SEQ ID NO: 426) и белком NCTR2 человека (SEQ ID NO: 427), показывающее гомологию между двумя белками. Консенсусная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 446. На фиг. 1В проиллюстрировано выравнивание последовательности на основе структуры между несколькими белками TREM и другими членами семейства, TREM-1 человека (SEQ ID NO: 429), TREM-2 человека (SEQ ID NO: 430), TREM-1 мыши (SEQ ID NO: 431), TREM-2 мыши (SEQ ID NO: 432), TREM-3 мыши (SEQ ID NO: 433), NKp44 (SEQ ID NO: 434), α TCR человека (SEQ ID NO: 435), β TCR человека (SEQ ID NO: 436), γ TCR человека (SEQ ID NO: 437), δ TCR человека (SEQ ID NO: 438), Vd человека (SEQ ID NO: 439), hIGG1 мыши (SEQ ID NO: 440), IGG1 мыши (SEQ ID NO: 441), CD8 человека (SEQ ID NO: 442) и CTLA4 человека (SEQ ID NO: 443). Нумерация аминокислотных остатков соответствует зрелой последовательности белка TREM1 человека. Элементы вторичной структуры TREM1 проиллюстрированы в виде стрелок для β цепей и цилиндров для α спиралей. Аминокислотные остатки, участвующие в образовании гомо- и гетеродимеров, показаны на черном фоне. Остатки цистеина, которые образуют дисульфидные связи и которые сохраняются для укладки Ig по типу V, обозначены жирным шрифтом и отмечены звездочками. Пробелы обозначаются знаком "-". Остатки M-1, нарушающие режим формирования антитело-подобного димера, отмечены замкнутыми треугольниками как в (например, Radaev et al., (2003) Structure. 11 (12): 1527-1535).

На фиг. 2А проиллюстрировано выравнивание аминокислотной последовательности между белком TREM1 человека (SEQ ID NO: 428) и белком TREM2 человека (SEQ ID NO: 426), показывающее гомологию между двумя белками. Консенсусная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 447. На фиг. 2В проиллюстрированы аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи антител Ат21 и Ат52. Последовательности CDR являются подчеркнутыми в каждой последовательности. Области последовательности в промежутке между каждой подчеркнутой последовательностью CDR соответствуют каркасным областям. На фиг. 2С проиллюстрированы аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи антител Ат21 и Ат52. Последовательности CDR являются подчерк-

нутыми в каждой последовательности. Области последовательности в промежутке между каждой подчеркнутой последовательностью CDR соответствуют каркасным областям.

На фиг. 3А проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие связывание антител Ат21, Ат52, Ат16, Ат20, Ат66 и Ат68 TREM2 с клеточной линией мыши (BWZ T2), экспрессирующей рекомбинантный TREM2 мыши. На фиг. 3В проиллюстрированы антитела Ат21 и Ат52, связывающиеся с ДТ (Trem +/+) и TREM2 (TREM2 -/-) макрофагами костного мозга мыши (BMMac). Заштрихованные гистограммы демонстрируют отрицательную популяцию антител TREM2. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2.

На фиг. 4А проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие связывание антител Ат21, Ат52, Ат43 и Ат60 TREM2 с линией клеток человека (293), экспрессирующей рекомбинантный слитый белок TREM2-DAP12 человека. Заштрихованные гистограммы демонстрируют отрицательную популяцию антитела TREM2. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2. На фиг. 4В проиллюстрированы антитела Ат21, Ат52, Ат43 и Ат60, связывающиеся с первичными дендритными клетками человека (чДК). Заштрихованные гистограммы демонстрируют негативный контроль только вторичных антител. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2.

На фиг. 5А проиллюстрированы точечные графики FACS, демонстрирующие экспрессию маркеров клеточной поверхности CD83 и CD86 на человеческих дендритных клетках (ДК) после инкубации со связанными на планшете антителами Ат21 или Ат52 к TREM2. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа. Графики основывались на пороговом значении CD11c⁺ HLA-DR⁺ LIN⁻ ДК. Процент клеток в пределах порогового значения CD83+CD86+ отображается на каждом графике. На фиг. 5В проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие экспрессию маркера клеточной поверхности CD86 на человеческих дендритных клетках (ДК) после инкубации с перекрестно-сшитыми антителами Ат21 или Ат52 к TREM2. Антитела были перекрестно-сшиты со вторичным антителом к человеку. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа.

На фиг. 6А проиллюстрировано фосфорилирование Syk, определяемое вестерн-блоттингом, в TREM2-дефицитной (Trem2 -/-) мыши и мыши дикого типа (левая и центральная панели), и макрофагах человека (правая панель) после инкубации с антителами Ат21 и Ат52 к TREM2. Антитела Ат89 и Ат92 являются неагонистическими негативными контролями. На фиг. 6В проиллюстрировано фосфорилирование Syk, определяемое вестерн-блоттингом, в первичных дендритных клетках человека после инкубации с антителами Ат21 и Ат52 к TREM2.

На фиг. 7А проиллюстрировано фосфорилирование DAP12, определяемое вестерн-блоттингом, в макрофагах мыши после инкубации с антителом Ат52 к TREM2. На фиг. 7В проиллюстрировано фосфорилирование DAP12, определяемое с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах дикого типа мыши и TREM2-дефицитных (TREM2 -/-) макрофагах мыши после инкубации с антителом Ат21 к TREM2.

На фиг. 8 проиллюстрировано конкурентное связывание между антителами TREM2 и бактериями *E.coli*, экспрессирующими предполагаемый лиганд TREM2 с клеточными линиями мыши и человека, экспрессирующими TREM2. Бактериальное связывание выражается в процентах от контроля. Среднее из двух независимых экспериментов; черные полосы: отсутствие разницы в изотипическом контроле, красные столбцы: значительное отличие от изотипического контроля (ANOVA).

На фиг. 9А проиллюстрированы белковые уровни воспалительных цитокинов ФНОα, ИЛ-6, ИЛ-10 и МХБ-1, секретируемых в ответ на стимуляцию макрофагов ДТ и TREM2 КО макрофагов медиаторами воспаления ЛПС или зимозаном. На фиг. 9В проиллюстрированы белковые уровни воспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНОα, секретируемых в ответ на стимуляцию макрофагов ДТ, гетерозиготных (Het) TREM2 и TREM2 КО макрофагов цитокинами ИЛ-4 или ИФНγ.

На фиг. 10А проиллюстрированы данные FACS, демонстрирующие экспрессию маркеров клеточной поверхности CD86 и CD206 на макрофагах ДТ, гетерозиготных (Het) TREM2 и TREM2 КО макрофагах после стимуляции цитокинами ИЛ-4 или ИФНγ. На фиг. 10В проиллюстрирована экспрессия маркера клеточной поверхности CD86 на макрофагах ДТ и TREM2 КО макрофагах после стимуляции медиаторами воспаления ЛПС или Зимозаном.

На фиг. 11А проиллюстрировано количество живых макрофагов ДТ, гетерозиготных по TREM2 (TREM2 +/-) и TREM2 КО (TREM2 -/-) после культивирования в факторе роста МКСФ в течение указанного количества дней. На фиг. 11В проиллюстрированы графики FACS, демонстрирующие окрашивание макрофагов ДТ, гетерозиготных по TREM2 (TREM2 +/-) и TREM2 КО (TREM2 -/-) после культивирования в

МКСФ в течение 6 дней (+МКСФ) или в МКСФ в течение 4 дней, после чего МКСФ не использовали в течение 36 ч (-МКСФ). Процент живых макрофагов в пределах порогового значения CD11b+DAPI- указан на каждом графике. На фиг. 11С проиллюстрированы уровни люминесценции, детектируемые в анализе жизнеспособности люциферазы после культивирования клеток ДТ и TREM2 КО дендритных клеток, макрофагов М1 и макрофагов М2 в факторе роста ГМ-КСФ, М-КСФ или М-КСФ+ИЛ-4, соответственно. На фиг. 11D проиллюстрирована частота живых макрофагов ДТ, гетерозиготных по TREM2 (Het) и TREM2 КО (CD11b+) после культивирования в медиаторах воспаления ИФНγ, ЛПС или зимоза-

не.

На фиг. 12 проиллюстрирован фагоцитоз апоптозных клеток и *E.coli* макрофагами, полученными из костного мозга (BMmacs), дикого типа (ДТ) и TREM2 KO (TREM2 -/-), культивированными без добавления МКСФ.

На фиг. 13 проиллюстрирована эпитопная карта антитела Ат52 к TREM2.

На фиг. 14 проиллюстрировано фосфорилирование Syk, как определено с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах дикого типа мыши дефицитных по TREM2 (Trem2 -/-) после инкубации с антителами MAB17291 (RD) к TREM2 или 78.18, демонстрируя, что антитело 78.18 не индуцирует фосфорилирование Syk или передачу сигналов TREM2.

На фиг. 15А проиллюстрирован анализ Fortebio, демонстрирующий одновременное связывание антитела MAB17291 и антитела Ат21 с TREM2-Fc. На фиг. 15А проиллюстрирован анализ Fortebio, демонстрирующий одновременное связывание антитела MAB17291 и антитела Ат52 с TREM2-Fc.

На фиг. 16 проиллюстрирован процент увеличения выживаемости макрофагов, полученных из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутных по TREM2 (KO), культивируемых в присутствии связанного на планшете перекрестно-сшитого антитела Ат21 или Ат52 к TREM2 Fabs и М-КСФ. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа.

На фиг. 17А проиллюстрирован анализ жизнеспособности по люминесценции макрофагов, полученных из костного мозга мыши, культивируемых в присутствии растворимого, не перекрестно-сшитого антитела Ат21 или Ат52 к TREM2 Fabs и М-КСФ. Антитело Ат99 представляет собой негативный контроль изотипа. На фиг. 17В проиллюстрирован анализ жизнеспособности по люминесценции макрофагов, полученных из костного мозга мыши, культивируемых в присутствии растворимого полноразмерного антитела Ат21 или Ат52 к TREM2 и М-КСФ. Антитело Ат91 представляет собой негативный контроль изотипа. Пунктирная линия "NT" указывает на среднюю жизнеспособность, полученную у необработанных макрофагов (без добавления антител). Пунктирная линия "без МКСФ" указывает на среднюю жизнеспособность, полученную при культивировании макрофагов в отсутствие М-КСФ.

На фиг. 18А проиллюстрирована индукция TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью связанных на планшете, полноразмерных антител Ат21 и Ат52 к TREM2, с использованием репортерного гена люциферазы в клеточном анализе. На фиг. 18В проиллюстрирована индукция TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью связанного на планшете фосфатидилсерина (ФС). На фиг. 18С проиллюстрирована активация TREM2-зависимого гена ИЛ-6 в макрофагах мыши с помощью связанных на планшете Ат21 и Ат52 Fab антител Fab к TREM2. На фиг. 18D проиллюстрирована активация TREM2-зависимого гена МХБ-1 в макрофагах мыши с помощью связанных на планшете Ат21 и Ат52 Fab антител Fab к TREM2. Данные на фиг. 18С и 18D проиллюстрированы как средние значения \pm СО; n=3 мыши на группу. На фиг. 18С и 18D "без Ат" иллюстрирует негативный контроль без обработки антителом, "21" означает обработку Ат21 Fab, "52" обозначает обработку Ат52 Fab, а "ктр" означает обработку контрольным антителом Fab.

На фиг. 19 проиллюстрировано ингибирование TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью растворимых, полноразмерных антител Ат21 и Ат52 к TREM2, с использованием репортерного гена люциферазы в клеточном анализе.

На фиг. 20А проиллюстрированы аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи антител к TREM2. Последовательности CDR являются подчеркнутыми в каждой последовательности. Области последовательности в промежутке между каждой подчеркнутой последовательностью CDR соответствуют каркасным областям. На фиг. 20В проиллюстрированы аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи антител к TREM2. Последовательности CDR являются подчеркнутыми в каждой последовательности. Области последовательности в промежутке между каждой подчеркнутой последовательностью CDR соответствуют каркасным областям.

На фиг. 21А проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие связывание антител Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 TREM2 с клеточной линией мыши (BWZ T2), экспрессирующей рекомбинантный TREM2 мыши. На фиг. 21В проиллюстрированы антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65, связывающиеся с ДТ (Trem +/+) и TREM2-дефицитными (TREM2 -/-) макрофагами костного мозга мыши (BMMac). Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа. Заштрихованные гистограммы демонстрируют отрицательную популяцию антител TREM2. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2.

На фиг. 22А проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие связывание TREM2 антител Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат43, Ат45, Ат60 и Ат65 с линией клеток человека (293), экспрессирующей рекомбинантный слитый белок TREM2-DAP12 человека. Заштрихованные гистограммы демонстрируют отрицательную популяцию антитела TREM2. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2. На фиг. 22В проиллюстрированы антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат43, Ат45, Ат60 и Ат65, связывающиеся с первичными дендритными клетками человека (чДК). Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа. Заштрихованные гистограммы демонстрируют негативный контроль только вторичных антител. Черные очерченные гистограммы демонстрируют позитивную популяцию антитела TREM2.

На фиг. 23А проиллюстрированы точечные графики FACS, демонстрирующие экспрессию маркеров клеточной поверхности CD83 и CD86 на человеческих дендритных клетках (ДК) после инкубации со связанными на планшете TREM2 антителами Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа. Графики основывались на пороговом значении CD11c⁺ HLA-DR⁺ LIN⁻ ДК. Процент клеток в пределах порогового значения CD83+CD86⁺ отображается на каждом графике. На фиг. 23В проиллюстрированы гистограммы FACS, демонстрирующие экспрессию маркера клеточной поверхности CD86 на человеческих дендритных клетках (ДК) после инкубации с перекрестно-сшитыми TREM2 антителами Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65. Антитела были перекрестно-сшиты со вторичным антителом к человеку. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа.

На фиг. 24А проиллюстрировано фосфорилирование Syk, как определено с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах дикого типа мыши дефицитных по TREM2 (Trem2^{-/-}) после инкубации с антителами Ат1, Ат9 или Ат45 к TREM2. Антитела Ат89 и Ат92 представляет собой негативный контроль изотипа. На фиг. 24В проиллюстрировано фосфорилирование Syk, как определено с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах человека после инкубации с антителами Ат1, Ат9, Ат14, Ат20, Ат22, Ат45 и Ат65 к TREM2. Антитела Ат16 и Ат77 являются неагонистическими негативными контролями. На фиг. 24С проиллюстрировано фосфорилирование Syk, как определено с помощью вестерн-блоттинга в первичных дендритных клетках человека после инкубации с антителами Ат1, Ат5, Ат9, Ат22, Ат45 или Ат65 к TREM2.

На фиг. 25 проиллюстрировано конкурентное связывание между антителами Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45, Ат65, Ат66 и Ат68 к TREM2 и клетками E.coli, экспрессирующими предполагаемый лиганд TREM2 с клеточными линиями мыши и человека, экспрессирующими TREM2. Бактериальное связывание выражается в процентах от контроля. Среднее из двух независимых экспериментов; черные полосы: отсутствие разницы в изотипическом контроле, красные столбцы: значительное отличие от изотипического контроля (ANOVA).

На фиг. 26А проиллюстрировано фосфорилирование DAP12, как определено с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах мыши после инкубации с антителом Ат45 или Ат65 к TREM2. На фиг. 26В проиллюстрировано фосфорилирование DAP12, как определено с помощью вестерн-блоттинга в макрофагах дикого типа мыши и TREM2-дефицитных (TREM2^{-/-}) макрофагах мыши после инкубации с антителом Ат1, Ат9, Ат22 или Ат45 к TREM2.

На фиг. 27А проиллюстрирована эпитопная карта антител Ат1 и Ат9 к TREM2. На фиг. 27В проиллюстрирована эпитопная карта антител Ат45 и Ат65 к TREM2.

На фиг. 28 проиллюстрирован анализ ForteBio, демонстрирующий одновременное связывание антитела MAV17291 и антител Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 с TREM2-Fc. Контрольные антитела Ат63 и Ат87 не связывались одновременно с TREM2-Fc.

На фиг. 29 проиллюстрирован процент увеличения выживаемости макрофагов, полученных из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутных по TREM2 (КО), культивируемых в присутствии связанного на планшете перекрестно-сшитого антитела Ат22, Ат45 или Ат65 к TREM2 Fabs и М-КСФ. Антитело Ат88 представляет собой негативный контроль изотипа.

На фиг. 30А проиллюстрирован анализ жизнеспособности по люминесценции макрофагов, полученных из костного мозга мыши, культивируемых в присутствии Fab растворимого, не перекрестно-сшитого антитела к TREM2 и М-КСФ. Антитело Ат99 представляет собой негативный контроль изотипа. На фиг. 30В проиллюстрирован анализ жизнеспособности по люминесценции макрофагов, полученных из костного мозга мыши, культивируемых в присутствии растворимых полноразмерных антител к TREM2 и М-КСФ. Антитело Ат91 представляет собой негативный контроль изотипа. Пунктирная линия "NT" указывает на среднюю жизнеспособность, полученную у необработанных макрофагов (без добавления антител). Пунктирная линия "без МКСФ" указывает на среднюю жизнеспособность, полученную при культивировании макрофагов в отсутствие М-КСФ.

На фиг. 31А проиллюстрирована индукция TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью связанных на планшете, полноразмерных антител к TREM2, с использованием репортерного гена люциферазы в клеточном анализе. На фиг. 31В проиллюстрирована индукция TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью связанных на планшете, полноразмерных антител к TREM2, с использованием репортерного гена люциферазы в клеточном анализе. На фиг. 31С проиллюстрирована индукция TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью связанного на планшете фосфатидилсерина (ФС).

На фиг. 32 проиллюстрировано ингибирование TREM2-зависимой генной экспрессии с помощью растворимых, полноразмерных антител к TREM2, с использованием репортерного гена люциферазы в клеточном анализе.

На фиг. 33 проиллюстрировано конкурентное связывание между антителами Ат22 и Ат45 к TREM2 и Фосфатидилсерин (ФС) или Сфингомиелином (СМ) в клеточных линиях мыши и человека, экспрессирующих TREM2.

На фиг. 34А проиллюстрирована активация TREM2-зависимого гена ИЛ-6 в макрофагах мыши с помощью связанных на планшете Ат22 и Ат65 Fab антител Fab к TREM2. На фиг. 34В проиллюстриро-

вана активация TREM2-зависимого гена МХБ-1 в макрофагах мыши с помощью связанных на планшете Ат22 и Ат65 Fab антител Fab к TREM2. Данные на фиг. 34А и 34В проиллюстрированы как средние значения \pm CO; n=3 мыши на группу. На фиг. 34А и 34В "без Ат" иллюстрирует негативный контроль без обработки антителом, "22" означает обработку Ат22 Fab, "65" обозначает обработку Ат65 Fab, а "ктр" означает обработку контрольным антителом Fab.

Подробное описание сущности изобретения

Общие методы.

Способы и процедуры, описанные или упомянутые в данном документе, как правило, хорошо известны и обычно используются с использованием обычной методики специалистами в данной области техники, такие как, например, широко используемые методики, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995 год)), Harlow and Lane, ред. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, и *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Определения.

В данном контексте термин "предотвращение" включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен, восприимчив к конкретному заболеванию, нарушению или патологическому состоянию или подвергаться риску развития такого заболевания, нарушения или патологического состояния, но еще не имеет установленного диагноза заболевания, нарушения или патологического состояния.

В данном контексте индивидуум "подвергающийся риску" развития конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния может иметь или не может иметь обнаруженного заболевания или симптомов заболевания, и может иметь или может не иметь проявления обнаруженного заболевания или симптомов заболевания до начала использования способов лечения, описанных в данном документе. "Подвергающийся риску" означает, что индивидуум имеет один или более факторов риска, которые являются измеримыми параметрами, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, как это известно в данной области техники. Индивидуум, имеющий один или более из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния, чем индивидуум без одного или более из этих факторов риска.

В данном контексте термин "лечение" относится к клиническим вмешательствам, направленным на изменение естественного течения заболевания у индивидуума, подвергаемого лечению, в процессе клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают в себя уменьшение скорости прогрессирования, уменьшение интенсивности или временное ослабление патологического состояния и ремиссию, или улучшенный прогноз конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния. Индивидуум является успешно "прошедшим лечение", например, если один или более симптомов, связанных с конкретным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием смягчается или устраняется.

"Эффективное количество" относится к количеству, эффективному при таких дозировках и в течение таких периодов времени, которые необходимы для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Эффективное количество может быть обеспечено за одно или более введений.

"Терапевтически эффективное количество" представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, необходимую для осуществления измеримого улучшения конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния. В данном контексте терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела пациента и способности антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 превосходят

токсические или вредные эффекты.

В данном контексте введение "в сочетании" с другим соединением или композицией включает в себя одновременное введение и/или введение в разное время. Введение в сочетании также включает в себя введение как совместной лекарственной формы, так и введение в форме отдельных композиций, включая различные частоты приема или интервалы, и использование одного способа введения или разных способов введения.

"Индивидуум" в целях лечения, профилактики или снижения риска относится к любому животному, относящемуся к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также зоопарковых животных, животных для участия в спортивных мероприятиях или домашних любимцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и тому подобные. Предпочтительно, индивидуум представляет собой человека.

В данном контексте термин "иммуноглобулин" (Ig) используется взаимозаменяемо с термином "антитело". В данном документе термин "антитело" используется в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

Основная единица 4-цепочечного антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Объединение в пару V_H и V_L приводит к формированию единичного антигенсвязывающего сайта. Структура и свойства различных классов антител представлены, например, в Basic and Clinical Immunology, 8 Ed, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (ред.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994 год, pp 71 Vol 6.

L-цепь любого вида позвоночных животных может быть отнесена к одному из двух четко различаемых типов, называемых каппа ("κ") и лямбда ("λ"), исходя из аминокислотных последовательностей их консервативных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH), иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначенные соответственно альфа ("α"), дельта ("δ"), эпсилон ("ε"), гамма ("γ") и мю ("μ"). Классы γ и α дополнительно подразделяются на подклассы на основании относительно незначительных различий в последовательности CH и функции, например, человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Хорошо известны субъединичная структура и трехмерная конфигурация различных классов иммуноглобулинов, которые, в целом, описаны, например, в публикации Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4 Ed. (W.B. Saunders Co., 2000 год).

"Нативные антитела" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой приблизительно 150000 Да, 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 цепи также имеет расположенные с равными интервалами внутрицепочечные дисульфидные мостики. На одном конце каждой тяжелой цепи находится вариабельный домен (V_H), а затем - ряд константных доменов. На другом конце каждой легкой цепи находится вариабельный домен (V_L), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки должны образовывать область разделения между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

"Выделенное" антитело, такое как выделенное антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию, представляет собой антитело, которое идентифицируется и выделяется и/или извлекается из компонента его природно-окружающей среды (например, естественным или рекомбинантным путем). Предпочтительно выделенный полипептид не связан с всеми другими компонентами загрязнителей из его природно-окружающей среды. Загрязняющие компоненты из его природно-окружающей среды такие как те, которые получены из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые могут отрицательно влиять на исследовательское, диагностическое или терапевтические применения антитела, и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворимые вещества. В предпочтительных вариантах реализации изобретений полипептид будет очищен: (1) более чем на 95% по массе антитела, согласно, например, методике Лоури, а в некоторых вариантах реализации изобретения - более чем на 99% по массе; (2) до уровня, достаточного для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности посредством использования секвенатора с вращающейся чашкой, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания с помощью кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных Т-клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природной среды антитела не будет присутствовать. При этом, как правило, выделенный полипептид или

антитело будут получены посредством по меньшей мере одного этапа очистки.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела, такого как антитело к TREM2 или антитело к DAP12 по настоящему описанию относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут обозначаться как "V_H" и "V_L", соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что среди антител некоторые сегменты вариабельных доменов сильно различаются по последовательностям, например антитела к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию. V домен обуславливает антигенное связывание и определяет специфичность конкретного антитела к своему конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по всему диапазону вариабельных доменов. Вместо этого она сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями (HVR). Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый вариабельный домен нативных легких и тяжелых цепей содержит четыре области FR, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. HVR каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости от областей FR и, вместе с HVR другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5 Ed, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991 год)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

В данном контексте термин "моноклональные антитело" относится к антителу, такому как моноклональное антитело к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию, полученному 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 и т.д.), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против единственного антигенного сайта. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигена. Кроме своей специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они синтезируются культурой гибридомы, незагрязненной другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональное" указывает на свойство антитела, как на полученное из практически гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование относительно продуцирования антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые предполагается применять в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включая, например, метод гибридом (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975 год); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995 год), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 Ed. 1988 год); Hammerling et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981 год)), способы рекомбинантных ДНК (см., например, патенты США № 4816567), методы фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991 год); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992 год); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004 год); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004 год); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-472 (2004 год); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), и технологии продуцирования антител человека или аналогов антител человека в организмах животных, которые частично или полностью содержат локусы или гены иммуноглобулинов человека, 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 год); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993 год); 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 год); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994 год); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994 год); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996 год); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996 год); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995 год).

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "полное антитело" используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию в его, по существу, интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. Конкретнее, полные антитела включают в себя такие обладающие тяжелой и легкой цепями, включая фрагмент Fc. Константные домены могут быть константными доменами нативной последовательности (например, человеческими константными доменами нативной последовательности) или их вариантами аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

Фрагмент антитела содержит часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую

или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995 год)); молекулы антител с одной цепью и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

При расщеплении папаином антител, таких как антитела к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые фрагментами "Fab", и остаточный фрагмент "Fc", указывающий на хорошую способность к кристаллизации. Фрагмент Fab состоит из целой L-цепи вместе с доменом вариабельной области H-цепи (V_H) и первым константным доменом одной из тяжелых цепей (C_{H1}). Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию с антигеном, т.е. содержит единственный сайт связывания с антигеном. Обработка антитела пепсином позволяет выделить одиночный крупный фрагмент F(ab')₂, который приблизительно соответствует двум фрагментам Fab с различной антигенсвязывающей активностью, соединенным дисульфидной связью, и сохраняет способность к перекрестному сшиванию антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab тем, что несут несколько дополнительных остатков на карбокси-конце домена C_{H1}, включая один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном документе представляет собой обозначение Fab', в котором остаток(ки) цистеина в константных доменах несет(ут) свободную тиоловую группу. Фрагменты антител F(ab')₂ первоначально получали в виде пар фрагментов Fab', между которыми расположены шарнирные остатки цистеина. Кроме того, известны другие варианты химического соединения фрагментов антител.

Фрагмент Fc содержит карбокси-концевые фрагменты обеих H-цепей, соединенные друг с другом дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются последовательностями области Fc, которую также распознают рецепторы Fc (FcR), встречающиеся на некоторых типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера вариабельных доменов одной тяжелой и одной легкой цепей, жестко связанных посредством нековалентных связей. При укладке этих двух доменов наружу выступают шесть гипервариабельных петель (по 3 петли из H- и L-цепи), аминокислотные участки которых участвуют в связывании с антигеном и придают антителу специфичность по отношению к связыванию антигена. В то же время, даже одиночный вариабельный домен (или половина фрагмента Fv, включающая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью по сравнению с полноразмерным сайтом связывания.

"Одноцепочечные Fv", также сокращенно обозначаемые как "sFv" или "scFv" представляют собой фрагменты антител, включающие домены V_H и V_L, соединенные в составе одиночной полипептидной цепи. Предпочтительно, полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий sFv формировать структуру, требуемую для связывания с антигеном. Для обзора sFv см. Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, том. 113, Rosenberg and Moore ed, Springer-Verlag, New York, pp 269-315 (1994 год).

"Функциональные фрагменты" антител, таких как антитела к TREM2 и/или DAP12 по настоящему описанию, содержат часть интактного антитела, как правило, включающую антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или F-область антитела, которая сохраняет способность связывания FcR или обладает модифицированной способностью связывания FcR. Примеры фрагментов антитела включают линейное антитело, молекулы одноцепочечного антитела и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антитела.

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, благодаря чему достигается межцепочечное, а не внутрицепочечное сопряжение доменов V, приводящее к образованию бивалентного фрагмента, т.е. фрагмента, несущего два сайта связывания с антигеном. Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры двух "пересекающихся" фрагментов sFv, в которых домены V_H и V_L двух антител присутствуют на различных полипептидных цепях. Диатела подробнее описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993 год).

В данном контексте, "химерное антитело" относится к антителу (иммуноглобулину), такому как химерное антитело к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984 год)). Представляющие интерес в данном документе химерные антитела включают антитела PRIMATIZED®, причем антигенсвязывающая область антитела образована антителом, полученным, например, путем иммунизацией макака представляющим интерес антигеном. В данном контексте "гуманизованное антитело" применяют в качестве подтипа "химерных антител".

"Гуманизированные" формы антител, отличных от человеческих (например, мышинных), таких как гуманизированные формы антител к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, образованную иммуноглобулином не человека. В одном варианте реализации изобретения гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками HVR не относящегося к человеку вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, имеющими требуемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки FR иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в антителе реципиента или в антителе донора. Эти модификации могут быть внесены для дополнительного улучшения характеристики антитела, такой как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют гипервариабельным петлям последовательности иммуноглобулина не человека, и все или по существу все из областей FR представляют собой области FR последовательности иммуноглобулина человека, хотя области FR могут включать замену одного или более отдельных остатков FR, которые улучшают характеристики антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.п. Количество этих аминокислотных замен в FR, как правило, составляет не более 6 в N-цепи, и не более 3 в L-цепи. Гуманизированное антитело также необязательно будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека. Для дополнительной информации см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986 год); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988 год); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992 год). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Алл. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998 год); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995 год); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США № 6982321 и 7087409.

"Антитело человека" представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12, раскрытые в настоящем описании, продуцируемого человеком и/или полученного с использованием любого из способов получения антител человека, как описано в данном документе. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получить, используя различные методики, известные в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991 год); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991 год). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985 год); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991 год). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001 год). Антитела человека можно получать введением антигена трансгенному животному, которое модифицировано для продукции таких антител в ответ на иммунизацию антигеном, и эндогенные локусы которых заблокированы, например, иммунизированных хеномице (см., например, патенты США № 6075181 и 6150584 в которых описана технология XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006 год) в отношении антител человека, полученных технологией В-клеточных гибридом человека.

Как используют в данном документе, термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" относится к областям переменного домена антитела, такого как в антителе к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию, которые обладают гипервариабельными последовательностями 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 проявляют наибольшее многообразие из шести HVR, и, в частности, полагают, что H3 играет уникальную роль в обеспечении высокой специфичности антител. См., например, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000 год); Johnson and Wu в *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ред., Human Press, Totowa, NJ, 2003 год). Действительно, 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 год) и Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996 год).

В данном документе используется и охватывается ряд определений HVR. Области HVR, которые представляют собой определяющие комплементарность области по Kabat (CDR), основаны на вариабельности последовательности и используются наиболее широко (Kabat et al., выше). В противоположность этому, Chothia обращает внимание на локализацию структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987 год)). Области HVR AbM представляет собой компромисс между CDR Kabat и структурными петлями Chothia, и они используются программным обеспечением для модулирования антител Oxford Molecular's AbM. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждого из этих HVR указаны ниже.

Петля Kabat AbM Chothia Контакт

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 по Kabat)

H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35 (нумерация по Chothia)

H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

Области HVR могут содержать "удлиненные 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 реализации изобретения) (H2), и 93-102 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельных доменов пронумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений, удлиненных HVR.

Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

Выражение "нумерация остатков вариабельных доменов по Kabat" или "нумерация аминокислотных положений по Kabat", и их варианты, относится к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи из собрания антител в Kabat et al., supra. С использованием этой системы нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или HVR вариабельного домена, или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c, и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Kabat можно определять для данного антитела посредством выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Kabat последовательностью.

Система нумерации по Kabat, как правило, используется, когда речь идет об остатке в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5 Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991 год)). Как правило, "система нумерации EU" или "индекс EU" используется, 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 остатков антитела EU IgG1 человека. Ссылки на номера остатков в вариабельном домене антител означают нумерацию остатков по 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).

В данном контексте "Акцепторная каркасная область человека" представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, образованную из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, "образованная из" каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной последовательности каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, как эти области, или может содержать ранее существовавшие изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения число 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. Если ранее существовавшие аминокислотные изменения имеются в VH, предпочтительно, эти изменения происходят только в трех, двух или в одном положении 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные замены в этих положениях могут быть 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте реализации изобретения последовательность акцепторной каркасной области VL человека идентична последовательности каркасной области VL человека или консенсусной последовательности каркасной области человека.

"Консенсусная последовательность каркасной области человека" представляет собой каркасную область, которая представляет наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в отборе VL или VH каркасных последовательностей иммуноглобулина человека. Как правило, отбор VL или VH последовательностей иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей вариабельного домена. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу по Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991 год). Примеры включают для VL, подгруппа может быть подгруппой каппа I, каппа II, каппа I, каппа IV, как в Kabat et al., выше. Дополнительно для VH, подгруппа может быть подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III, как в Kabat et al., выше.

"Модификация аминокислот" в указанном положении, например, такого антитела, как антитело к TREM2 или антитело к DAP12 по настоящему описанию относится к замене или делеции указанного остатка, или вставке по меньшей мере одного аминокислотного остатка рядом с указанным остатком.

Вставка "рядом" с указанным остатком означает вставку в пределах одного или двух остатков от него. Вставка может быть N-концевой или C-концевой относительно указанного остатка. Предпочтительной модификацией аминокислот в данном документе является замена.

Антитело "с созревшей аффинностью", такое как антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 с созревшей аффинностью по настоящему описанию, 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, которое не обладает этим изменением(ями). В одном варианте реализации изобретения антитело с созревшей аффинностью обладает наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в данной области техники. Например, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992 год) описывает созревание аффинности посредством перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков HVR и/или каркасной области описан, например: 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 год); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995 г); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992 год).

В данном контексте термин "специфически распознает" или "специфически связывает" относится к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как притяжение или связывание между мишенью и антителом, например, между антителом к TREM2 и TREM2 или антителом к DAP12 и DAP12, что является решающим фактором в присутствии мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, такое как антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию, которое специфически или предпочтительно связывает мишень или эпитоп, представляет собой антитело, которое связывает эту мишень или эпитоп с большей аффинностью, авидностью, более охотно и/или более продолжительно, чем оно связывается с другими мишенями или другими эпитопами мишени. Из этого определения становится также понятно, например, и то, что антитело (или его фрагмент), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Как таковое, "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" необязательно требует (хотя оно может и включать в себя) исключительное связывание. Антитело, специфически связывающееся с мишенью, может иметь константу ассоциации, равную по меньшей мере около 10^3 M^{-1} или 10^4 M^{-1} , иногда около 10^5 M^{-1} или 10^6 M^{-1} , в других случаях около 10^6 M^{-1} или 10^7 M^{-1} , около 10^8 M^{-1} до 10^9 M^{-1} , или около 10^{10} M^{-1} до 10^{11} M^{-1} или выше. Для отбора антител, обладающих специфической иммунореактивностью в отношении определенного белка, могут быть использованы разные иммуноанализы. Например, твердофазные иммунологические анализы ELISA, применение которых вошло в повседневную практику, используются для отбора моноклональных антител, обладающих специфической иммунореактивностью с белком. См., например, Harlow and Lane (1988 год) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, для описания форматов и условий иммунологического анализа, который может использоваться для определения специфической иммунореактивности.

В данном контексте "взаимодействие" между белком TREM2 или белком DAP12 и вторым белком охватывает, не ограничиваясь ими, белок-белковое взаимодействие, физическое взаимодействие, химическое взаимодействие, связывание, ковалентное связывание, и ионное связывание. В данном контексте антитело "ингибирует взаимодействие" между двумя белками, в случае если антитело нарушает, снижает или полностью устраняет взаимодействие между двумя белками. Антитело или его фрагмент по настоящему описанию "ингибирует взаимодействие" между двумя белками, в случае если антитело или его фрагмент связывается с одним из этих двух белков.

Антитело "агонист" или "активирующее" антитело представляет собой антитело, такое как агонистическое антитело к TREM2 или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию, которое индуцирует (например, увеличивает) одну или более активностей или функций антигена после того, как антитело связывается с антигеном.

Антитело "антагонист" или "блокирующее" антитело представляет собой антитело, такое как агонистическое антитело к TREM2 или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию, которое уменьшает или устраняет (например, снижает) связывания антигена с одним или более лигандами после того, как антитело связывается с антигеном, и/или, которое уменьшает или устраняет (например, снижает) одну или более активностей или функций антигена после того, как антитело связывается с антигеном.

"Эффекторные функции" антитела относятся к биологической активности, обусловленной областью Fc (областью Fc нативной последовательности или областью Fc варианта аминокислотной последовательности) антитела и варьируют в зависимости от изотипа антитела.

В данном контексте термин "Fc область" применяется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc области нативной последовательности и Fc области вариантов. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут меняться, Fc область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют, как область от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбокси-конца. C-концевой остаток лизина (остаток 447 по EU системе нумерации) Fc области может быть удален, например, в процессе продуцирования или очистки антитела, или посред-

вом рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител, у которых удалены все остатки K447, популяции антител, у которых не удален ни один остаток K447 и популяции антител, содержащих смесь антител, имеющих и не имеющих остаток K447. Подходящие Fc области с нативной последовательностью для применения в антителах по изобретению включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека.

"Fc область нативной последовательности" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности природной Fc области. Fc области нативной последовательности включают Fc область нативной последовательности человеческого IgG1 (не-A и A аллотипы); Fc область нативной последовательности человеческого IgG2; Fc область нативной последовательности человеческого IgG3; и Fc область нативной последовательности человеческого IgG4, а также их варианты естественного происхождения.

"Вариант Fc области" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности Fc области нативной последовательности в силу модификации по меньшей мере одной аминокислоты, предпочтительно одной или более аминокислотной заменой (замена).

Предпочтительно вариант Fc области содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью Fc области или с Fc областью исходного полипептида, например содержит от около одной до около десяти аминокислотных замен и, предпочтительно, от около одной до около пяти аминокислотных замен в нативной последовательности Fc области или в Fc области исходного полипептида. Вариант Fc области по данному описанию, предпочтительно, по меньшей мере на около 80% гомологичен Fc области нативной последовательности и/или Fc области исходного полипептида и, наиболее предпочтительно, гомологичен им по меньшей мере на около 90%, более предпочтительно, гомологичен им по меньшей мере на около 95%.

"Fc рецептор" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с Fc областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Более того, предпочтительный FcR представляет собой рецептор, который связывает. Более того, предпочтительный FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсируемые формы этих рецепторов, FcγRII рецепторы включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, которые различаются главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив ("ITAM") в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив ("ITIM") в своем цитоплазматическом домене. (См., например, M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997 год)). FcR рассмотрены в статье Ravetch и Kinet, (*Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991 год); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994 год); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995 год). Термином "FcR" по данному описанию охватываются другие FcR, которые должны быть идентифицированы в будущем. FcR также могут увеличить период полувыведения антител.

Анализ связывания с человеческим FcRn *in vivo* и сывороточный период полувыведения полипептидов с высокой аффинностью связывания с человеческим FcRn можно осуществить, например, на трансгенных мышах или на трансфицированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или на приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc области. В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с повышенным или пониженным связыванием с FcRs. См. также, например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001 год).

В данном контексте, "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" и "гомологии" относительно пептидной, полипептидной или последовательности антитела означает процентное содержание аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, идентичной аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и не рассматривая любые консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществить различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, используя общедоступное программное обеспечение, такое как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения степени выравнивания, включая любые алгоритмы, известные в данной области техники, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, такое как антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой

кислоты, с которой она обычно связана в окружающей среде, в которой она была произведена. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота не связана со всеми компонентами, с которыми она связана в среде продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, описанные в данном документе, представлены в иной форме, чем форма или условия, в которых они находятся в природе. Следовательно, выделенные молекулы нуклеиновых кислот отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, описанные в данном документе, существующей естественным образом в клетках.

В данном контексте термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является "плазида", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, с которой могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно интегрировать в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. В данном документе такие векторы называются "рекомбинантными экспрессионными векторами" или просто "экспрессионными векторами". Как правило, экспрессионные векторы, применяемые в методах рекомбинантной ДНК, часто находятся в виде плазмид. В настоящем описании термины "плазида" и "вектор" могут употребляться взаимозаменяемо, так как плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

Термины "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 можно включить в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или реакции синтеза. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, например, метилированные нуклеотиды и их аналоги. В случае ее присутствия модификацию нуклеотидной структуры можно осуществлять до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может содержать модификацию(и), осуществленную после синтеза, такую как конъюгация с меткой. Другие типы модификации включают, например, "кэпы", замену одного или более нуклеотидов естественного происхождения на аналог, межнуклеотидные модификации, например, такие как модификации за счет не имеющих заряда связей (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, и т.д.) и за счет имеющих заряд связей (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), модификации, содержащие боковые цепи, например, такие как белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, *ply-L*-лизин и т.д.), модификации с интеркалирующими веществами (например, акридин, псорален и т.д.), модификации, содержащие вещества, образующие хелаты (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислители металлов и т.д.), модификации, содержащие алкилирующие агенты, модификации с модифицированными сцеплениями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотидов. Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно имеющаяся в сахарах, может быть замещена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена обычными защитными группами или активирована с целью образования дополнительных связей с другими нуклеотидами, или может быть конъюгирована с твердыми или полутвердыми подложками. 5' и 3' концевые группы ОН могут быть фосфорилированными или могут быть заменены аминогруппами или органическими кэпирующими группами, содержащими от 1 до 20 углеродных атомов. Другие гидроксильные группы также могут быть дериватизированы обычными защитными группами. Полинуклеотиды могут также содержать аналоги Сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые, как правило, известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и основные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одну или более фосфодиэфирных связей можно заместить альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваясь ими, варианты реализации изобретения, в которых фосфатная группа заменена на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формцеталь"), где каждый заместитель R или R' независимо обозначает H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралкил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Описанное выше применимо ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

"Клетка-хозяин" включает в себя индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или которая была реципиентом вектора (векторов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают в себя предшественника индивидуальной клетки-хозяина, причем указанный

предшественник необязательно должен быть полностью идентичен (морфологически или на уровне комплементарной геномной ДНК) исходной родительской клетке, в силу природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает в себя клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по настоящему изобретению.

В данном контексте "носители" включают фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергаемых их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат 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; спирты сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

В данном контексте термин "около" относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. В данном документе ссылка на "около" в отношении значения или параметра включает (и описывает) варианты реализаций изобретения, которые касаются значения или параметра, по сути.

В данном контексте и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Например, ссылка на "антитело" представляет собой ссылку на от одного до нескольких антител, таких как молярные количества, и включает его эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

Следует понимать, что аспект и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и варианты реализации изобретения, определяемые терминами "содержащие", "состоящие из" и/или "состоящие по существу из".

Обзор.

Настоящее изобретение относится к антителам к TREM2 и/или к DAP12, которые обладают одной или более агонистическими или антагонистическими активностями; способам получения и применения таких антител; фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела; нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела; и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения и без ограничения теорией, полагают, что агонистические активности антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию обусловлены, по меньшей мере частично, способностью антител индуцировать или сохранять кластеризацию рецептора TREM2 на поверхности клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения считается, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 могут индуцировать или сохранять кластеризацию рецептора TREM2 *in vivo* с помощью не только специфического связывания с TREM2, но и посредством связывания с рецепторами Fc на соседних клетках, что приводит к кластеризации антитела, которое, в свою очередь, агрегирует TREM2. Предпочтительно, некоторые изоформы иммуноглобулинов, включая, не ограничиваясь ими, IgG2 и IgM, имеют естественную способность индуцировать или сохранять кластеризацию целевых антигенов (например, TREM2) без связывания с рецепторами Fc на соседних клетках. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистические активности TREM2 могут быть определены или протестированы *in vitro* с помощью любого из нескольких методов, описанных в данном документе, (см., например, Примеры 23-26, 34-37, 41-44, 52-55, и 67-68), включая, не ограничиваясь ими, связанные с чашкой Петри/планшетом полоноразмерные антитела к TREM2 для увеличения плотности антител, подверженных воздействию TREM2, и перекрестно-сшитые антитела к TREM2.

Соответственно, некоторые аспекты настоящего описания основаны по меньшей мере частично на идентификации антител к TREM2 и/или антител к DAP12, которые способны связываться как с TREM2 человека, так и с мышинными TREM2 с высокой степенью аффинности (см., например, Примеры 1 и 40); которые конкурируют с TREM2-лигандом для связывания с лиганд-связывающим сайтом на TREM2 человека и мышинном TREM2 (см., например, Примеры 26 и 43); и которые демонстрируют одну или более агонистических активностей TREM2, включая, не ограничиваясь ими, индукцию CD83⁺CD86⁺ дендритных клеток (см., например, Примеры 23 и 41), индукцию TREM2 нисходящей сигнальной молекулы Syc в макрофагах и дендритных клетках (см., например, Примеры 24 и 42), индукцию TREM2 сигнальной адаптерной молекулы DAP12 в макрофагах (см., например, Примеры 25 и 44), индукцию клеточной выживаемости врожденных иммунных клеток, таких как макрофаги (см., например, Примеры 34 и 52) и активацию TREM2-зависимой генной экспрессии (см., например, Примеры 36, 38, 54, 56 и 68).

Дополнительные аспекты настоящего описания основаны по меньшей мере частично на неожиданном открытии того, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут также вызывать антагонистические активности, в случае, если антитело продуцируется или, иным образом,

форматируется таким образом, что теряет способность индуцировать или сохранять кластеризацию рецептора TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию характеризуются одной или более антагонистическими активностями TREM2, включая, не ограничиваясь ими, ингибирование клеточной выживаемости врожденных иммунных клеток ((см., например, Примеры 35 и 53) и ингибирование TREM2-зависимой генной экспрессии (см., например, Примеры 37, 55 и 67).

Белки TREM2.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с белком TREM2 по настоящему описанию и модулируют одну или более активностей TREM2 после связывания с белком TREM2, который экспрессируется в клетке.

Белки TREM2 по настоящему описанию включают, не ограничиваясь ими, белок TREM2 млекопитающего, белок TREM2 человека (учетный номер UniProt Q9NZC2), мышинный белок TREM2 (учетный номер Q99NH8), белок TREM2 крысы (учетный номер Uniprot D3ZZ89), белок TREM2 макаки-резус (учетный номер Uniprot F6QVF2), бычий белок TREM2 (учетный номер Uniprot Q05B59), лошадиный белок TREM2 (учетный номер Uniprot F7D6L0), свиной белок TREM2 (учетный номер Uniprot H2EZZ3) и собачий белок TREM2 (учетный номер Uniprot E2RP46). В данном контексте "белок TREM2" относится как к последовательностям дикого типа, так и к вариантным последовательностям естественного происхождения.

Триггерный рецептор, который экспрессируется на миелоидных клетках-2 (TREM2), известен под такими названиями, как TREM-2, Trem2a, Trem2b, Trem2c, триггерный рецептор, который экспрессируется на миелоидных клетках-2a и триггерный рецептор, который экспрессируется на моноцитах-2. TREM2 представляет собой мембранный белок, состоящий из 230 аминокислот. TREM2 представляет собой иммуноглобулин-подобный рецептор, который главным образом экспрессируется в клетках миелоидного происхождения, включая, не ограничиваясь ими, макрофаги, дендритные клетки, остеокласты, микроглию, моноциты, клетки Лангерганса кожи, клетки Купфера. В некоторых вариантах реализации изобретения TREM2 образует рецептор-сигнальный комплекс с DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения TREM2 фосфорилирует и посылает сигналы посредством DAP12 (адаптерный белок, содержащий ITAM домен). В некоторых вариантах реализации изобретения передача сигнала TREM2 приводит к нисходящей активации ФИЗК или других внутриклеточных сигналов. Сигналы на миелоидных клетках, Toll-подобных рецепторах (TLR) имеют важное значение для активации активностей TREM2, например, в контексте ответа на инфекцию. TLR также играют ключевую роль в патологическом воспалительном ответе, например, TLR экспрессируются в макрофагах и дендритных клетках.

В некоторых вариантах реализации изобретения пример аминокислотной последовательности TREM2 человека приведен ниже в SEQ ID NO: 1:

```

10      20      30      40      50      60
MEPLRLILL FVTELSGAHN TTVFQGVAGQ SLQVSCPYPD MKHWGRRKAW CRQLGKKGPC

70      80      90      100     110     120
QRVVSTHNLW LLSFLRRWNG STAITDDTLG GTLTITLRLN QPHDAGLYQC QSLHGSEADT

130     140     150     160     170     180
LRKVLVEVLA DPLDHRDAGD LWFPGESESF EDAHVEHSIS RSLLEGEIPF PPTSILLLLA

190     200     210     220     230
CIFLIKILAA SALWAAAWHG QKPGTHPPSE LDCGHDPGYQ LQTLPLGLRDT

```

В некоторых вариантах изобретения TREM2 человека представляет собой белок-предшественник, который включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах реализации изобретения TREM2 человека представляет собой зрелый белок. В некоторых вариантах изобретения зрелый белок TREM2 человека не включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах изобретения зрелый белок TREM2 экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения TREM2 содержит сигнальный пептид, расположенный в аминокислотных остатках 1-18 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1); внеклеточный иммуноглобулинподобный домен варибельного типа (IgV), расположенный в аминокислотных остатках 29-112 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1); дополнительные внеклеточные последовательности, расположенные в аминокислотных остатках 113-174 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1); трансмембранный домен, расположенный в аминокислотных остатках 175-195 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1); и внутриклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 196-230 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1).

Трансмембранный домен TREM2 человека содержит лизин в аминокислотном остатке 186, который может взаимодействовать с аспарагиновой кислотой в DAP12, являющийся ключевым адаптерным белком, который трансдуцирует сигналы от TREM2, TREM1 и других родственных членов семейства IgV.

Гомологи TREM2 человека включают, не ограничиваясь ими, рецептор естественной клетки-киллера (NK) NK-p44 (NCTR2), рецептор полимерного иммуноглобулина (pIgR), CD300E, CD300A, CD300C и TREML1/TLT1. В некоторых вариантах реализации изобретения NCTR2 имеет сходство с TREM2 в домене IgV.

Белки DAP12.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с белком DAP12 по настоящему описанию и модулируют одну или более активностей DAP12 после связывания с белком DAP12, который экспрессируется в клетке.

Белки DAP12 по настоящему описанию включают, не ограничиваясь ими, белок DAP12 млекопитающего, белок DAP12 человека (учетный номер UniProt O43914), мышинный белок DAP12 (учетный номер UniProt O54885), белок крысы DAP12 (учетный номер UniProt Q6X9T7), белок DAP12 макаки-резус (учетный номер UniProt Q8WNQ8), бычий белок DAP12 (учетный номер UniProt Q95J80), и свиной белок DAP12 (учетный номер UniProt Q9TU45). В данном контексте "белок DAP12" относится как к последовательностям дикого типа, так и к вариантным последовательностям естественного происхождения.

DNAX-активирующий белок 12 (DAP12) известен под такими названиями, как киллер-активирующий рецептор-связанный белок, KAR-связанный белок (KARAP), PLOSL, PLO-SL, белок TYRO и тирозинкиназа связывающий белок. DAP12 представляет собой мембранный белок, состоящий из 113 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения DAP12 функционирует как трансмембранный сигнальный полипептид, который содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Он может ассоциироваться с мембранными гликопротеинами семейства ингибиторных рецепторов клеток киллеров (KIR) и может выполнять роль активатора трансдукции сигнала. В других вариантах реализации изобретения белок DAP12 может связывать протеинкиназу массой 70 кДа (ZAP-70), ассоциированную с зета-цепью (TCR), и тирозинкиназу селезенки (Syk), и играть важную роль в трансдукции сигнала, моделировании кости, миелинизации головного мозга и воспалении.

Мутации в пределах гена, кодирующего DAP12, были связаны с поликистозной липомембранной остеодисплазией со склерозной лейкоэнцефалопатией (ПЛОСЛ), также известной как болезнь Насу-Хакола. Безотносительно к какой-либо теории можно считать, что рецептор DAP12 представляет собой TREM2, который также вызывает ПЛОСЛ. Было идентифицировано множество альтернативных вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы DAP12. DAP12 нековалентно связывается с активирующими рецепторами семейства CD300. перекрестное сшивание комплексов CD300-TYROBP/DAP12 приводит к клеточной активации, такой как активация нейтрофилов, опосредованная интегрином. DAP12 представляет собой гомодимер; дисульфид-связанный белок. В некоторых вариантах реализации изобретения DAP12 взаимодействует с SIRPB1, TREM1, CLECSF5, SIGLEC14, CD300LB, CD300E и CD300D благодаря сходству и посредством домена ITAM, а также с SYK с помощью домена SH2. В других вариантах реализации изобретения DAP12 активирует Syk, которая вызывает интегрин-опосредованную активацию нейтрофилов и макрофагов. В других вариантах реализации изобретения DAP12 взаимодействует с KLRC2 и KIR2DS3.

В некоторых вариантах реализации изобретения пример аминокислотной последовательности DAP12 человека приведен ниже в SEQ ID NO: 2:

```

      10      20      30      40      50      60
MGGLEPCSRLL LLLPLLLAVS GLRPVQAQAQ SDCSCSTVSP GVLGIVMGD LVLTVLIALA
      70      80      90     100     110
VYFLGRLVPR GRGAAEAATR QRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYK

```

В некоторых вариантах изобретения DAP12 человека представляет собой белок-предшественник, который включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах реализации изобретения DAP12 человека представляет собой зрелый белок. В некоторых вариантах изобретения зрелый белок DAP12 человека не включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах изобретения зрелый белок DAP12 экспрессируется в клетке. DAP12 представляет собой однопроходной мембранный белок первого типа. Он содержит внеклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 22-40 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2); трансмембранный домен, расположенный в аминокислотных остатках 41-61 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2); и внутриклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 62-113 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2). Домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM) расположен в аминокислотных остатках 80-118 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах реализации изобретения остаток аспарагиновой кислоты в DAP12 взаимодействует с трансмембранным доменом TREM2 человека, который содержит лизин в аминокислотном остатке 186, и трансдуцирует сигналы от TREM2, TREM1 и других родственных членов семейства IgV.

Антитела к TREM2 и антитела к DAP12.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к антителам, которые специфически связываются с TREM2 и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию связываются со зрелым белком TREM2 и/или зрелым белком DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию связываются со зрелым белком TREM2 и/или зрелым белком DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения, антитела по настоящему описанию связываются с белком TREM2 и/или белком DAP12, которые экспрессируются на одной или более клеток человека, выбранных из дендритных клеток человека, макрофагах человека, моноцитах человека, остеокластах человека, клетках Лангерганса кожи человека, купферовых клетках человека и/или

клетках микроглии человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию представляют собой инертные антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию представляют собой антагонистические антитела.

Агонистические антитела.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию как правило связываются с одним или более белков TREM2 и/или белков DAP12, экспрессируемых в клетке. Один класс антител представляет собой агонистические антитела. Например, как полагают, для трансдукции сигнала рецептору TREM2 необходима кластеризация на поверхности клетки. Таким образом, агонистические антитела могут иметь уникальные возможности для стимулирования, например рецептора TREM2. Например, они могут иметь правильную специфичность антигенной детерминанты, совместимую с активацией рецепторов, а также способность индуцировать или сохранить кластеризацию рецепторов на поверхности клетки.

Антитела могут вызывать кластеризацию рецепторов *in vivo*, используя нескольких потенциальных механизмов. Некоторые изоформы антител человека, такие как IgG2, благодаря своей уникальной структуре имеют естественную способность вызывать кластеризацию рецепторов или сохранять рецепторы в кластерной конфигурации, тем самым активируя такие рецепторы, как TREM2 без связывания с Fc-рецептором (например, White et al., (2015 год) *Cancer Cell* 27, 138-148).

Другие антитела вызывают кластеризацию рецепторов (например, TREM2) путем связывания с рецепторами Fc γ на соседних клетках. Связывание константной части Fc IgG антитела с рецепторами Fc приводит к кластеризации антител, и антитела, в свою очередь, агрегируют рецепторы, с которыми они связываются посредством своих переменных областей (Chu и et al (2008 год) *Mol. Immunol.*, 45:3926-3933; и Wilson et al., (2011 год) *Cancer Cell* 19, 101-113). Связывание с ингибирующим рецептором Fc γ RIIb (Fc γ RIIb), которое не вызывает секреции цитокинов, окислительной реакции, повышения фагоцитоза и усиленной антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), часто является предпочтительным способом кластеризации антител *in vivo*, поскольку связывание с Fc γ RIIb не приводит к нежелательным иммунным реакциям.

Другие механизмы могут быть также использованы для кластеризации рецепторов (например, TREM2). Например, фрагменты антител, (например, фрагментов Fab) перекрестно-сшитых друг с другом, могут быть использованы для кластеризации рецепторов (например, TREM2) аналогично антителам с фрагментами Fc, которые связываются с рецепторами Fc γ , как описано выше. Безотносительно к какой-либо теории можно считать, что перекрестно-сшитые фрагменты антител (например, фрагменты Fab) могут функционировать в качестве агонистических антител, если они вызывают кластеризацию рецепторов на поверхности клетки и связываются с соответствующим эпитопом на мишени (например, TREM2).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитела, которые связывают белок TREM2 и/или белок DAP12, могут включать агонистические антитела, которые благодаря своей эпитопной специфичности связывают TREM2 и/или DAP12 и активируют одну или более активностей TREM2 и/или DAP12. Безотносительно к какой-либо теории можно считать, что такие антитела могут связываться с лиганд-связывающим сайтом на антигене-мишени (например, TREM2 и/или DAP12) и имитировать действие природного лиганда или стимулировать антиген-мишень трансдуцировать сигнал посредством связывания с одним или более доменами, которые не являются лиганд-связывающими сайтами. Такие антитела не будут препятствовать связыванию лиганда и могут действовать аддитивно или синергически с природными лигандами.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело по настоящему описанию представляет собой агонистическое антитело, которое индуцирует одну или более активностей TREM2, одну или более активностей DAP12 или одну или более активностей TREM2 и одну или более активностей DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело вызывает одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 после связывания с белком TREM2 и/или белком DAP12, который экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения, одна или более активностей TREM2, одна или более активностей DAP12 или обе активности выбраны из группы, состоящей из: связывания TREM2 с DAP12; связывания DAP12 с TREM2; фосфорилирования TREM2, фосфорилирования DAP12; активации ФИЗК; повышенной экспрессии одного или более противовоспалительных цитокинов; повышенной экспрессии одного или более противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов), выбранных из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10; пониженной экспрессии одного или более провоспалительных цитокинов, пониженной экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ-1 β , ФНО, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, МХБ-1 и СРБ; пониженной экспрессии ФНО- α , пониженной экспрессии ИЛ-6; фосфорилирования киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK); повышенной экспрессии С-С рецептора хемокина 7 (CCR7); индукции хемотаксиса клеток микроглии по отношению к

клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличения, нормализации, или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукции продуцирования остеокластов, увеличения уровня остеокластогенеза или и того и другого; увеличения выживаемости и/или функции одной или более макрофагов, клеток микроглии, макрофагов и/или клеток микроглии M1, активированных макрофагов и/или клеток микроглии M1, макрофагов и/или клеток микроглии M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера; индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дебриса нервной ткани, клиренса дебриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворного белка, клиренса болезнетворного пептида и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты; индукции фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворных нуклеиновых кислот (например, антисмысловая GGCCS (G2C4) экспансия повторов РНК); нормализации нарушенной TREM2/DAP12-зависимой геной экспрессии; вовлечения Syk, ZAP70 или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; фосфорилирования Syk; повышенной экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, макрофагах, моноцитах и/или микроглии; пониженной секреции одного или более воспалительных цитокинов, пониженной секреции одного или более воспалительных цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-1 β , ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17 и ИЛ-18; пониженной экспрессии одного или более воспалительных рецепторов; повышения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; понижения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ; повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов (например, ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) семейства факторов транскрипции).

Антитело, которое зависит от связывания с рецептором Fc γ R для активации целевых рецепторов, может потерять свою активность агониста, если оно создано для устранения Fc γ R связывания (см., например, Wilson et al., (2011 год) *Cancer Cell* 19, 101-113; Armour et al., (2003 год) *Immunology* 40 (2003 год) 585-593); и White et al., (2015 год) *Cancer Cell* 27, 138-148). Таким образом полагают, что антитело по настоящему описанию с правильной специфичностью антигенной детерминанты может быть агонистическим антителом и активировать антиген-мишень с минимальными нежелательными реакциями, в случае если антитело имеет Fc-домен от изотипа IgG2 человека (CH1 и шарнирная область) или другой тип домена Fc, который способен преимущественно связывать ингибирующие Fc γ RIII рецепторы или их варианты.

Типовые изотипы и модификации Fc агонистических антител приведены в табл. 2 ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет изотип Fc, указанный в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Типовые изотипы Fc агонистического антитела к TREM2

| Изотип Fc | Мутация (схема нумерации по EU и Kabat) |
|---------------------|--|
| IgG1 | N297A |
| IgG1 | D265A и N297A |
| IgG1 | L234A и L235A L234A и G237A L234A и L235A и G237A |
| IgG2 | V234A и G237A |
| IgG4 | L235A и G237A, и E318A |
| IgG4 | S228P и L236E |
| Гибрид IgG2/4 | IgG2 а.к. 118-260 и IgG4 а.к. 261-447 |
| IgG2 | 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 | ТЦ ДТ с каппа ЛЦ (легкая цепь) |
| | ТЦ C127S с каппа ЛЦ Каппа ЛЦ C214S Каппа ЛЦ C214S и ТЦ C233S Каппа ЛЦ C214S и ТЦ C232S Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с мутациями P330S и P331S Фрагмент F(ab') ₂ IgG1 ДТ и любая из вышеперечисленных мутаций |
| IgG1 | Замена константного домена тяжелой цепи 1 (CH1) и шарнирной области IgG1 на CH1 и шарнирную область IgG2 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNDHKPS NTKVDKTVK KCCVECPPEP (SEQ ID NO: 397) на каппа ЛЦ |
| IgG1 | Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с мутациями A330L и/или L234F и/или L235E и/или P331S |
| IgG1, IgG2 или IgG4 | Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с мутациями M252Y и/или S254T и/или T256E |
| Мышиный IgG1 | Для моделей заболеваний на мышах |
| IgG4 | ДТ |

В дополнение к изотипам, описанным в табл. 2 и безотносительно к какой-либо теории можно считать, что изотипы антител IgG1 или IgG3 человека и их мутанты (например, Strohl (2009 год) *Current Opinion in Biotechnology* 2009 год, 20:685-691), которые связывают активизирующие рецепторы Fcγ I, II, III, IV человека и/или рецепторы Fcγ I, III и IV мыши, могут также выступать в качестве агонистических антител *in vivo*, но могут приводить к нежелательным реакциям, связанным с АЗКЦ. Вместе с тем, такие рецепторы Fcγ, по всей видимости, менее доступны для связывания антителами *in vivo*, по сравнению с ингибирующим рецептором FcγRIIB (см., например, White, et al., (2013 год) *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 941-948; и Li et al., (2011 год) *IScience* 333 (6045):1030-1034).

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистические антитела имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

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

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом тяжелой цепи, который содержит аминокислотную замену C127S, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации. (White et al., (2015 год) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010 год) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; и WO 2008079246).

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом каппа легкой цепи, который содержит аминокислотную замену C214S, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации (White et al., (2015 год) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle et al., (2010 год) *PROTEIN SCIENCE* 19:753-762; и WO 2008079246).

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область IgG1 человека включает Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело связывает ингибирующий Fc-рецептор. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγIIВ). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с Fc-областью дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислотных замен выбраны из N297A (Bolt S. et al., (1993 год) *Eur. J. Immunol.* 23:403-411), D265A (Shields et al (2001 год) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604), L234A, L235A (Hutchins et al (1995 год) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994 год) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000 год) *Cell Immunol.*, 200:16-26), G237A (Alegre et al (1994 год) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu et al (2000 год) *Cell Immunol.*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007 год) *Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008 год) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008 год, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, и/или T256E, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело включает константный домен тяжелой цепи I(CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область (White et al., (2015 год) *Cancer Cell* 27, 138-148). В некоторых вариантах реализации изобретения CH1 и шарнирная область изотипа IgG2 содержит аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVERKCCVCEPPCP (SEQ ID NO:
397) .

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область антитела содержит S267E аминокислотную последовательность, L328F аминокислотную последовательность или обе, и/или N297A или N297Q аминокислотную последовательность, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации.

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область IgG4 человека включает Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело связывает ингибирующий Fc-рецептор. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIB (FcγIIb). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с Fc-областью дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислотных замен выбраны из L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000 год) *J. Immunol.*, 164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации.

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело имеет гибридный изотип IgG2/4. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело включает аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 в соответствии с нумерацией по Kabat, из IgG2 человека, и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека в соответствии с нумерацией по Kabat (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит константную область IgG4 мыши (Bartholomaeus et al. (2014 год). *J. Immunol.* 192, 2091-2098).

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E и /или P331S, где положение аминокислоты представлено в соответствии с EU или Kabat системой нумерации.

Инертные антитела.

Другой класс антител по настоящему описанию включает в себя инертные антитела. В данном контексте "инертные" антитела относятся к антителам, которые специфически связывают антигены-мишени, но не модулируют (например, снижают/ингибируют или активируют/индуцируют) функции антигена. Например, в случае TREM2 инертные антитела не модулируют связывание лиганда и/или активности TREM2. Безотносительно к какой-либо теории можно считать, что антитела, которые не обладают способностью к кластеризации TREM2 на поверхности клеток, могут быть инертными антителами, даже если они имеют специфичность антигенной детерминанты, совместимую с активацией рецепторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, которые связывают белок TREM2 и/или белок DAP12 могут включать антитела, которые связывают TREM2 и/или DAP12, но благодаря своей эпитопной специфичности не модулируют функцию белка. Такие функционально инертные антитела могут быть использованы в качестве носителя для доставки токсинов, как описано для антитела к CD33 гемтузумаб озогамидин (продается как Mylotarg), которое конъюгировано с цитотоксическим агентом из класса калихеамицинов и используется для определения и уничтожения опухолей при остром миелоидном лейкозе (Naito et al., (2000 год), *Leukemia*, 14, 1436-1443; Ricart (2011 год) *Clin Cancer Res* 17; 6417-6436; Hamann et al., (2002 год) *Journal: Bioconjugate Chemistry*, 13, 47-58; и Beitz соавт., (2001 год) *Clin. Cancer Res.* 7; 1490-6). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию являются инертными антителами, которые связывают TREM2 и/или DAP12, но не способны индуцировать одну или более активностей TREM2 (например, активность TREM2, описанная в данном документе) и/или активностей DAP12 (например, активность DAP12, описанная в данном документе).

Типовые изотипы и модификации Fc инертных антител приведены в табл. 3 ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения инертное антитело имеет изотип Fc, указанный в табл. 3 ниже.

Антагонистические антитела.

Третий класс антител по настоящему описанию включает в себя антагонистические антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, которые связывают белок TREM2 и/или белок DAP12 могут включать антагонистические антитела, которые связывают TREM2 и/или DAP12 и ингибируют одну или более активностей TREM2 и/или активностей DAP12, либо путем предотвращения взаимодействия между TREM2 и/или DAP12 и его лигандом(ми), либо путем предотвращения трансдукции сигнала от внеклеточного домена TREM2 и/или DAP12 в цитоплазму клетки в присутствии лиганда. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистические антитела по настоящему описанию

могут иметь эпитопную специфичность агонистического антитела по настоящему описанию, но иметь Fc-домен, который не способен связывать рецепторы Fcγ и, таким образом, не в состоянии, например, кластеризовать рецептор DAP12 и/или TREM2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело по настоящему описанию представляет собой антагонистическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело ингибирует одну или более активностей TREM2, и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело снижает активность одного или более TREM2-зависимых генов. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более TREM2-зависимых генов, включают, без ограничений, один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT). В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело снижает выживаемость макрофагов, клеток микроглии, макрофагов M1, клеток микроглии M1, макрофагов M2, клеток микроглии M2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и/или DAP12 и один или более лигандов TREM2 и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело ингибирует передачу сигнала TREM2 и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и/или DAP12 и один или более лигандов TREM2 и/или DAP12 и ингибирует передачу сигнала TREM2 и/или DAP12.

В некоторых вариантах реализации изобретения перекрестное сшивание антитела необходимо для агонистической функции антитела. Перекрестное сшивание антитела может происходить путем связывания с вторичным антителом *in vitro* или путем связывания с Fc-рецепторами *in vivo*. Например, антагонистические антитела могут быть преобразованы в агонистические антитела с помощью перекрестного сшивания биотин/стрептавидин или связывания вторичного антитела *in vitro* (см., например, Gravestein et al. (1996 год) J. Exp. Med. 184:675-685; Gravestein et al., (1994 год) International Immunol. 7:551-557). Агонистические антитела могут проявлять свою активность, имитируя биологическую активность лиганда рецептора или путем усиления кластеризации рецептора, активируя тем самым передачу сигналов рецептора. В некоторых вариантах реализации изобретения отсутствие перекрестного сшивания антитела необходимо для антагонистической активности. Антагонистические антитела могут проявлять свою активность путем блокирования взаимодействий рецептор-лиганд.

Типовые изотипы и модификации Fc антагонистических антител приведены в табл. 3 ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело имеет изотип Fc, указанный в табл. 3 ниже.

Изотипы инертного и антагонистического антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения инертные и/или антагонистические антитела к TREM2 по данному описанию включают один или более изотипов и модификаций Fc, указанных в табл. 3.

Таблица 3. Типовые изотипы инертного и антагонистического антитела к TREM2

| Изотип Fc | Мутация (схема нумерации по EU и Kabat) |
|-----------|--|
| IgG1 | N297A или N297Q |
| IgG1 | D265A и N297A |
| IgG1 | L234A и L235A |
| IgG2 | V234A и G237A |
| IgG4 | L235A и G237A, и E318A E233P и/или F234V N297A или N297Q |
| IgG4 | S228P и L236E S241P S241P и L248E |
| IgG2 | H268Q и V309L, и A330S, и P331S |
| IgG1 | C220S и C226S, и C229S и P238S |

| | |
|---------------------|---|
| IgG1 | C226S и C229S, и E233P и L234V, и L235A |
| IgG1 | E233P и L234V, и L235A и G236-делеция P238A D265A N297A A327Q или A327G P329A |
| IgG1 | K322A и L234A, и L235A |
| IgG1 | L234F и L235E, и P331S |
| IgG1 или IgG4 | T394D |
| IgG2 | C232S или C233S N297A или N297Q |
| IgG1, IgG2 или IgG4 | модификации дельта, а, b, с, ab, ac, g |
| IgG1 | Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с мутациями A330L или L234F и/или L235E и/или P331S |
| IgG1, IgG2 или IgG4 | Любые из вышеперечисленных мутаций вместе с мутациями M252Y и/или S254T и/или T256E |

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область IgG1 человека включает Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с Fc-областью дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислотных замен выбраны из N297A, N297Q (Bolt S. et al., (1993 год) Eur. J. Immunol. 23:403-411), D265A, L234A, L235A (McEarchern et al., (2007 год) Blood, 109:1185-1192), C226S, C229S (McEarchern et al., (2007 год) Blood, 109:1185-1192), P238S (Davis et al., (2007 год) J. Rheumatol., 34:2204-2210), E233P, L234V (McEarchern et al., (2007 год) Blood, 109:1185-1192), P238A, A327Q, A327G, P329A (Shields R.L. et al., (2001 год) J. Biol. Chem. 276(9):6591-604), K322A, L234F, L235E (Hezareh et al., (2001 год) J. Virol. 75, 12161-12168; Oganessian et al., (2008 год). Acta Crystallographica 64, 700-704), P331S (Oganessian et al., (2008 год) Acta Crystallographica 64, 700-704), T394D (Wilkinson et al (2013 год) MAbs 5(3): 406-417), A330L, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты представлено в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело имеет изотип IgG1 с константным доменом тяжелой цепи, который содержит аминокислотную замену C220S, в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен, выбранных из A330L, L234F; L235E, и/или P331S в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит константную область IgG2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область IgG2 человека включает Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с Fc-областью дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислотных замен выбраны из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты представлено в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения константная область IgG4 человека включает Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен (например, по сравнению с Fc-областью дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислотных замен выбраны из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A (Hutchins et al. (1995 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11980-11984), S228P, L236E, S241P, L248E (Reddy et al., (2000 год) J. Immunol., 164:1925-1933; Angal et al., (1993 год) Mol. Immunol. 30(1):105-8; US 8614299 B2), T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, и/или N297Q, где положение аминокислоты представлено в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен, выбранных из M252Y, S254T и/или T256E, где положение аминокислоты представлено в соответствии с нумерацией EU или Kabat.

Дополнительные мутации IgG.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более вариантов IgG1, описанных в данном документе, могут быть объединены с мутацией A330L (Lazar et al., (2006 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:4005-4010) или одной или более мутациями L234F, L235E и/или P331S (Sazinsky et al., (2008 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105:20167-20172), где положение аминокислоты представлено в соответствии с нумерацией EU или Kabat. В некоторых вариантах реализации изобретения варианты IgG, описанные в данном документе, могут быть объединены с одной или более мутациями, чтобы увеличить период полувыведения антитела в сыворотке крови человека (например, мутации M252Y, S254T, T256E в соответствии с нумерацией EU или Kabat) (Dall'Acqua et al., (2006 год) J Biol Chem, 281:23514-23524; и Strohl et al., (2009 год) Current Opinion in Biotechnology, 20:685-691).

В некоторых вариантах реализации изобретения вариант IgG4 по настоящему описанию может быть объединен с мутацией S228P в соответствии с нумерацией EU или Kabat. (1993 год) Mol. Immunol., 30:105-108) и/или с одной или более мутациями, описанными в Peters et al., (2012 год) J. Biol. Chem. 13; 287 (29): 24525-33) для повышения стабильности антител.

Антитела к TREM2.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к антителам к TREM2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела, которые индуцируют одну или более активностей TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела, которые способствуют выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения, антитела к TREM2 по настоящему описанию способствуют выживаемости макрофагов, клеток микроглии, клеток микроглии M1, активированных клеток микроглии M1, клеток микроглии M2, дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера. В некоторых вариантах реализации изобретения содействие выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток включает увеличение выживаемости клеток или иначе замедление гибели клеток. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию способствуют выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию замедляют клеточную гибель одной или более врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения содействие выживаемости клеток и/или увеличение выживаемости клеток определяют путем измерения клеточной выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток в присутствии антитела к TREM2 по сравнению с клеточной выживаемостью соответствующих одной или более врожденных иммунных клеток в отсутствие антитела к TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения замедление клеточной гибели определяют путем измерения клеточной гибели одной или более врожденных иммунных клеток в присутствии антитела к TREM2 по сравнению с клеточной гибелью соответствующих одной или более врожденных иммунных клеток в отсутствие антитела к TREM2. Могут быть использованы любые подходящие способы измерения выживаемости клеток или гибели клеток, известные в данной области техники и описанные в данном документе (см., например, Примеры 30, 34, 35, 38, 52, 53 и 56). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела, которые повышают экспрессию ИЛ-6. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела, которые способствуют выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток и повышают экспрессию ИЛ-6. Могут быть использованы любые подходящие способы измерения экспрессии ИЛ-6 в клетке, известные в данной области техники и описанные в данном документе (см., например, Примеры 28, 38 и 68).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой инертные или антагонистические антитела, которые ингибируют одну или более актив-

ностей TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой инертные или агонистические антитела, которые снижают выживаемость одной или более врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения, антитела к TREM2 по настоящему описанию снижают выживаемость макрофагов, клеток микроглии, клеток микроглии M1, активированных клеток микроглии M1, клеток микроглии M2, дендритных клеток, макрофагов, макрофагов M1, активированных макрофагов M1, макрофагов M2, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшение выживаемости клеток определяют путем измерения клеточной выживаемости одной или более врожденных иммунных клеток в присутствии антагонистического антитела к TREM2 по сравнению с клеточной выживаемостью соответствующих одной или более врожденных иммунных клеток в отсутствии антагонистического антитела к TREM2. Могут быть использованы любые подходящие способы измерения выживаемости клеток или гибели клеток, известные в данной области техники и описанные в данном документе (см., например, Примеры 30, 34, 35, 38, 52, 53 и 56).

В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело к TREM2 по настоящему описанию конкурирует за связывание с TREM2 с одним или более лигандами TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антитело человека, гуманизованное антитело, биспецифическое антитело, мультвалентное антитело или химерное антитело. Типовые описания таких антител приводятся в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

В некоторых вариантах изобретения белок TREM2 экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию модулируют (например, индуцируют или ингибируют) одну или более активностей TREM2. Активности TREM2, модулированные (например, индуцированные или ингибированные) с помощью антител к TREM2 могут включать, не ограничиваясь ими, фосфорилирование DAP12; фосфорилирование TREM2; вовлечение Syk, ZAP70 или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; активацию ФИЗК; повышенную экспрессию противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов); пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов; фосфорилирование ERK; повышенную экспрессию CCR7, индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличение, нормализацию или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукцию продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и того и другого; повышенную выживаемость и/или функция клеток микроглии и/или макрофагов (таких как клеток макрофагов M1 и/или клеток микроглии M1, активированных макрофагов M1 и/или клеток микроглии M1, и/или макрофагов M2 и/или клеток микроглии M2), дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера; индукцию клиренса апоптотических нейронов; пониженную экспрессию ФНО- α ; фосфорилирование SYK; повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, моноцитах, макрофагов и/или микроглии; пониженную секрецию одного или более воспалительных цитокинов (таких как, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6 и/или МХБ-1); пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов (таких как CD86); повышенный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; пониженный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; и/или повышенную активность одного или более TREM2-зависимых генов (например, ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) из семейства факторов транскрипции). Антитела к TREM2 по настоящему описанию могут быть использованы для предупреждения, снижения риска или лечения деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, остро и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдром Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и рака. Антитела к TREM2 по настоящему описанию также могут быть использованы в уходе за раной. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой моноклональные антитела. Антитела к TREM2 по настоящему описанию могут быть испытаны для индукции одной или более активностей TREM2 (например, автофосфорилирование TREM2; фосфорилирование DAP12; фосфорилирова-

ние Syk; вовлечение Syk, ZAP70 или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; активация ФИЗК; повышенная экспрессия цитокинов; пониженная экспрессия провоспалительных медиаторов; фосфорилирование ERK; повышенная экспрессия CCR7; индукция хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; созревание дендритных клеток из костного мозга; увеличение, нормализация или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; повышенная способность дендритных клеток, моноцитов, микроглии и/или макрофагов индуцировать пролиферацию Т-клеток; индукция продуцирования остеокластов, увеличения уровня остеокластогенеза или и того и другого; увеличенная выживаемость и функция дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера, и/или микроглии; индукция одного или более типов клиренса; индукция фагоцитоза одного или более апоптических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов, болезнетворной нуклеиновой кислоты или раковых клеток; пониженная секреция одного или более воспалительных цитокинов, пониженная экспрессия одного или более воспалительных рецепторов, повышенный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или клетками микроглии в условиях пониженных уровней МКСФ; пониженный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или клетками микроглии в присутствии нормальных уровней МКСФ; нормализация нарушенной TREM2/DAP12-зависимой генной экспрессии; и повышенная активность одного или более DAP12-зависимых генов), с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники и/или описанного в данном документе. Например, антитела к TREM2 можно анализировать *in vitro* на фосфорилирование тирозина TREM2, DAP12, Syk и/или ERK, путем анализа рекрутинга Syk и/или ZAP70 к DAP12, путем анализа активации ФИЗК, путем анализа индукции экспрессии цитокинов (например, ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10) или CCR7, или путем анализа пониженной экспрессии провоспалительных медиаторов (например, ИЛ- β и ФНО) со стимуляцией TLR (например, ЛПС, CpG ДНК или зимозана). Полезные анализы могут включать вестерн-блоттинг (например, для тирозин-фосфорилированного DAP12 или треонин/серин-фосфорилированных ФИЗК киназой субстратов), ИФА (например, для секретируемого интерлейкина или секреции цитокинов), FACS (например, для связывания антитела к TREM2 с TREM2), иммуноцитометрию (например, для тирозин-фосфорилированного DAP12 или треонин/серин-фосфорилированных ФИЗК киназой субстратов), анализы гена-репортера (например, для активации TLR), увеличенную выживаемость и/или функцию дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или микроглии, увеличенный фагоцитоз апоптотических нейронов, поврежденных синапсов, бета амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида А, медиана, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератопептилина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR), дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворного белка, болезнетворного пептида, болезнетворной нуклеиновой кислоты или раковых клеток макрофагами, дендритными клетками, клетками Лангерганса кожи, клетками Купфера, моноцитами, остеокластами и/или клетками микроглии, повышенную реорганизацию цитоскелета и пониженный провоспалительный ответ или другие анализы, известные в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию модулируют (т.е. повышают или снижают) экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных цитокинов (например, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-1 β , ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17 и ИЛ-18). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию повышают экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных цитокинов. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию снижают экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных цитокинов. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию модулируют (т.е. повышают или снижают) экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных рецепторов (например, CD86). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию повышают экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных рецепторов. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию снижают экспрессию и/или секрецию одного или более воспалительных рецепторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с TREM2 человека или его гомологом, включая, не ограничиваясь ими, белок TREM2 млекопитающего, белок TREM2 мыши (учетный номер UniProt Q99NH8), белок TREM2 крысы (учетный но-

мер Uniprot D3ZZ89), белок TREM2 макаки-резус (учетный номер Uniprot F6QVF2), бычий белок TREM2 (учетный номер Uniprot Q05B59), лошадиный белок TREM2 (учетный номер Uniprot F7D6L0), свиной белок TREM2 (учетный номер Uniprot H2EZZ3) и собачий белок TREM2 (учетный номер Uniprot E2RP46). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию специфически связываются с TREM2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию специфически связываются с TREM2 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию специфически связываются как с TREM2 человека, так и с TREM2 мыши. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию модулируют (например, индуцируют или ингибируют) по меньшей мере одну активность TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна активность TREM2 представляет собой фосфорилирование DAP12, фосфорилирования TREM2; активацию ФИЗК; повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов); пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов, повышенную выживаемость и/или функцию клеток микроглии, дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера; пониженную экспрессию ФНО- α , фосфорилирование SYK, повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, макрофагах, моноцитах и/или макрофагах, пониженную секрецию одного или более воспалительных цитокинов, пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов, повышенный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ, пониженный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ и/или повышенная активность одного или более TREM2-зависимых генов (например, ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) семейства факторов транскрипции).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с белком TREM2 по настоящему описанию и/или вариантами естественного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 связываются с TREM2 человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела или антагонистические антитела, которые связываются с белком TREM2 по настоящему описанию, который экспрессируется на поверхности клетки, и модулируют (например, индуцируют или ингибируют) по меньшей мере одну активность TREM2 по настоящему описанию после связывания с экспрессированным на поверхности белком TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой инертные антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 29-112 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-112 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 29-41 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-41 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 47-69 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 47-69 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 76-86 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 76-86 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 91-100 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 91-100 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 99-115 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 99-115 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 104-112 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 104-112 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 114-118 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 114-118 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков

At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию конкурентно ингибируют связывание по меньшей мере одного из следующих антител к TREM2: At1, At9, At14, At22, At45 и At65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом TREM2 человека, который является таким же, как эпитоп TREM2 или совпадает с эпитопом TREM2, связанным по меньшей мере одним антителом, выбранным из любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом TREM2 человека, который является таким же, как эпитоп TREM2 или совпадает с эпитопом TREM2, связанным по меньшей мере одним антителом, выбранным из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом TREM2 человека, который является таким же, как эпитоп TREM2 или совпадает с эпитопом TREM2, связанным по меньшей мере одним из следующих антител к TREM2: At1, At9, At14, At22, At45 и At65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связывают по существу тот же эпитоп TREM2, связанный по меньшей мере одним антителом, выбранным из любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связывают по существу тот же эпитоп TREM2, связанный по меньшей мере одним антителом, выбранным из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связывают по существу тот же эпитоп TREM2, связанный по меньшей мере одним из следующих антител к TREM2: At1, At9, At14, At22, At45 и At65. Подробные типовые 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).

В типовом конкурентном анализе иммобилизованный TREM2 или клетки, экспрессирующие TREM2 на поверхности клетки, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, связывающееся с TREM2 (например, человека или не являющегося человеком примат), и второе немеченое антитело, исследуемое на предмет способности конкурировать с первым антителом за связывание с TREM2. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный TREM2 или клетки, экспрессирующие TREM2, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубирования в условиях, допускающих связывание первого антитела с TREM2, удаляют избыток несвязанного антитела и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным TREM2 или клетками, экспрессирующими TREM2. Если количество метки, связанной с иммобилизованным TREM2 или клетками, экспрессирующими TREM2, существенно снижается в анализируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с TREM2. См., Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат (а) варибельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну, две, или три HVR, выбранных из HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, или выбранных из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; и/или (b) варибельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну, две и три HVR, выбранных из HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, или выбранных из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80,

At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87. В некоторых вариантах реализации изобретения HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 содержат CDR по Kabat, CDR по Chothia или контактные последовательности CDR, как показано в табл. 1 и/или табл. 8, или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-H1, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-H2, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-H3, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; (iv) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-L1, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; (v) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-L2, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87; и (vi) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность любой из последовательностей HVR-L3, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8 или из антитела, выбранного из At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At21, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At52, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87.

В некоторых вариантах реализации антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит одну или более: (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49; и (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119; и/или причем вариабельный домен легкой цепи содержит одну или более: (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137; (b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49; и (c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат вариабельную область тяжелой цепи любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, или выбранных из Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87; и/или вариабельную область легкой цепи любого из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, или выбранных из Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87.

Любые из антител по настоящему описанию могут быть получены с помощью клеточной линии. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточная линия может быть клеточной линией дрожжей. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточная линия может быть клеточной линией млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения клеточная линия может быть гибридной клеточной линией. Любая клеточная линия, известная в данной области техники, пригодная для продуцирования антител, может быть использована для получения антитела по настоящему описанию. Типовые клеточные линии для продуцирования антител являются описанными в настоящем описании.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело к TREM2, выбранное из Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело Ат1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, которое по существу связывает один и тот же эпитоп TREM2, что и Ат1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 вариабельных доменов тяжелой цепи моноклонального антитела Ат1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 вариабельных доменов легкой цепи моноклонального антитела Ат1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 вариабельных доменов тяжелой цепи и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 вариабельных доменов легкой цепи моноклонального антитела Ат1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 3; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 25; (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 50; (iv) HVR-L1, содержащей

тело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 переменных доменов тяжелой цепи моноклонального антитела Ат65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 переменных доменов легкой цепи моноклонального антитела Ат65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 переменных доменов тяжелой цепи и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 переменных доменов легкой цепи моноклонального антитела Ат65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 9; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 34; (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 101, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 101; (iv) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 124, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 124; (v) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 144, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 144; и (vi) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 215, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или в пределах аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом, который включает один или более аминокислотных остатков 43-50 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом, который включает один или более аминокислотных остатков 49-57 TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию конкурируют ингибируют связывание по меньшей мере одного из следующих антител к TREM2: Ат21 и Ат52. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию связываются с эпитопом TREM2 человека, который является таким же, как эпитоп TREM2 или совпадает с эпитопом TREM2, связанным по меньшей мере одним из следующих антител к TREM2: Ат21 и Ат52. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну, две, или три HVR, выбранных из HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 любого из антител Ат21 и Ат52; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну, две и три HVR, выбранных из HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 любого из антител Ат21 и Ат52. В некоторых вариантах реализации изобретения HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 содержат CDR по Kabat, CDR по Chothia или контактные последовательности CDR, как показано в табл. 1 и/или табл. 8. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат переменную область тяжелой цепи любого из антител Ат21 и Ат52; и/или переменную область легкой цепи любого из антител Ат21 и Ат52. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой моноклональное антитело Ат52 или Ат21. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, которое один и тот же эпитоп TREM2, что и Ат52 или Ат21. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 переменных доменов тяжелой цепи моноклонального антитела Ат52 или Ат21. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 переменных доменов легкой цепи моноклонального антитела Ат52 или Ат21. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой выделенное антитело, содержащее HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 переменных доменов тяжелой цепи и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 переменных доменов легкой цепи

моноклонального антитела Ат52 или Ат21. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 398, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 398; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 399 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 399; (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 400, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 400; (iv) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 401, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 401; (v) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 402, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 402 и (vi) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 403. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (i) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 404; (ii) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 405; (iii) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 406; (iv) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 407; (v) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 408; и (vi) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 409.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию содержат вариабельную область тяжелой цепи, и вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну, две или три последовательности HVR, выбранные из тех, которые перечислены в табл. 1 и/или в табл. 8; и/или содержит вариабельную область легкой цепи, и вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну, две и три последовательности HVR, выбранные из тех, которые перечислены в табл. 1 и/или в табл. 8.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию конкурирует за связывание с TREM2 с одним или более лигандами TREM2. Примеры подходящих лигандов TREM2 включают, но не ограничиваясь ими, клеток *E.coli*, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерионных липидов, отрицательно заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и липидированного амилоидного бета пептида. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения один или более лигандов TREM2 включают клетки *E.coli*, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерионных липидов, отрицательно заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и/или липидированного амилоидного бета пептида. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело.

Константы диссоциации (K_D) антител к TREM2 человека (например, слитые белки TREM2-Fc человека и мономерные белки TREM2 человека) и TREM2 мыши (например, слитые белки TREM2-Fc мыши) могут быть менее чем 10 нМ, менее чем 9,5 нМ, менее чем 9 нМ, менее чем 8,5 нМ, менее чем 8 нМ, менее чем 7,5 нМ, менее чем 7 нМ, менее чем 7 нМ, менее чем 6,9 нМ, менее чем 6,8 нМ, менее чем 6,7 нМ, менее чем 6,6 нМ, менее чем 6,5 нМ, менее чем 6,4 нМ, менее чем 6,3 нМ, менее чем 6,2 нМ, менее чем 6,1 нМ, менее чем 6 нМ, менее чем 5,9 нМ, менее чем 5,8 нМ, менее чем 5,75 нМ, менее чем 5,7 нМ, менее чем 5,6 нМ, менее чем 5,5 нМ, менее чем 5,4 нМ, менее чем 5,3 нМ, менее чем 5,2 нМ, менее чем 5,1 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 4,5 нМ, менее чем 4 нМ, менее чем 3,5 нМ, менее чем 3 нМ, менее чем 2,5 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1,5 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,95 нМ, менее чем 0,9 нМ, менее чем 0,85 нМ, менее чем 0,8 нМ, менее чем 0,75 нМ, менее чем 0,7 нМ, менее чем 0,65 нМ, менее чем 0,6 нМ, менее чем 0,55 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,45 нМ, менее чем 0,4 нМ, менее чем 0,35 нМ, ме-

нее чем 0,3 нМ, менее чем 0,29 нМ, менее чем 0,28 нМ, менее чем 0,27 нМ, менее чем 0,26 нМ, менее чем 0,25 нМ, менее чем 0,24 нМ, менее чем 0,23 нМ, менее чем 0,22 нМ, менее чем 0,21 нМ, менее чем 0,2 нМ, менее чем 0,15 нМ, менее чем 0,1 нМ, менее чем 0,095 нМ, менее чем 0,09 нМ, менее чем 0,085 нМ, менее чем 0,08 нМ, менее чем 0,075 нМ, менее чем 0,07 нМ, менее чем 0,065 нМ, менее чем 0,06 нМ, менее чем 0,055 нМ или менее чем 0,05 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации находятся в диапазоне от менее чем около 5,75 нм до менее чем около 0,09 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для слитых белков TREM2-Fc человека находятся в диапазоне от менее чем около 1,51 нм до менее чем около 0,35 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для мономерных белков TREM2 находятся в диапазоне от менее чем около 5,75 нм до менее чем около 1,15 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для слитых белков TREM2-Fc мыши находятся в диапазоне от менее чем около 0,23 нм до менее чем около 0,09 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для слитых белков TREM2-Fc человека находятся в диапазоне от менее чем около 0,71 нм до менее чем около 0,23 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для мономерных белков TREM2 находятся в диапазоне от менее чем около 6,70 нм до менее чем около 0,66 нМ. В некоторых вариантах реализации изобретения константы диссоциации антител к TREM2 для слитых белков TREM2-Fc мыши находятся в диапазоне от менее чем около 4,90 нм до менее чем около 0,35 нМ. Константы диссоциации могут быть определены с помощью любого аналитического метода, включая любой биохимический или биофизический метод, такой как ИФА, поверхностного плазмонный резонанс (ППР), биослойная интерферометрия (см, например, Octet System by ForteBio), изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), круговой дихроизм (КД), анализ методом остановленной струи и колориметрический и флуоресцентный анализы плавления белка. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой агонистическое антитело. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 представляет собой антагонистическое антитело.

Дополнительные антитела к TREM2, например антитела, которые специфически связываются с белком TREM2 по настоящему описанию, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу, или охарактеризованы относительно их физических/химических свойств и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники.

Антитела к DAP12.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к антителам к DAP12.

Антитела к DAP12 по настоящему описанию как правило связываются с одним или более белков DAP12, экспрессируемых в клетке. В некоторых вариантах изобретения белок DAP12 экспрессируется на поверхности клетки.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию представляют собой агонистические антитела или антагонистические антитела, которые связываются с белком DAP12 по настоящему описанию, который экспрессируется на поверхности клетки, и модулируют (например, индуцируют или ингибируют) по меньшей мере одну активность DAP12 по настоящему описанию после связывания с экспрессированным на поверхности белком DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию представляют собой инертные антитела.

В некоторых вариантах изобретения белок DAP12 экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию модулируют (например, индуцируют или ингибируют) одну или более активностей DAP12. Активности DAP12, модулированные (например, индуцированные или ингибированные) с помощью антител к DAP12 могут включать, но не ограничиваясь ими, связывание с TREM2, фосфорилирование DAP12; фосфорилирование TREM2; вовлечение Syk, ZAP70 или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; активацию ФИЗК; повышенную экспрессию противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов); пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов; фосфорилирование ERK; повышенную экспрессию CCR7, индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличение, нормализацию или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукцию продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и того и другого; повышенную выживаемость и/или функция клеток микроглии и/или макрофагов (таких как клеток макрофагов M1 и/или клеток микроглии M1, активированных макрофагов M1 и/или клеток микроглии M1, и/или макрофагов M2 и/или клеток микроглии M2), дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера; индукцию клиренса апоптотических нейронов; пониженную экспрессию ФНО- α ; фосфорилирование SYK; повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, моноцитах, макрофагов и/или микроглии; пониженную секрецию одного или более воспалительных цитокинов (та-

ких как, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6 и/или МХБ-1); пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов (таких как CD86); повышенный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; пониженный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; и/или повышенную активность одного или более TREM2-зависимых генов (например, ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) из семейства факторов транскрипции). Антитела к TREM2 по настоящему описанию могут быть использованы для предотвращения, уменьшения риска или лечения деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 по настоящему описанию представляют собой моноклональные антитела. Антитела к TREM2 по настоящему описанию могут быть испытаны для индукции одной или более активностей TREM2 (например, фосфорилирование DAP12; вовлечение Syk, ZAP70 или и того и другого в DAP12; активация ФИЗК; повышенная экспрессия противовоспалительных медиаторов; пониженная экспрессия провоспалительных медиаторов; фосфорилирование ERK; повышенная экспрессия CCR7, индукция хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличение, нормализация или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антигенспецифических Т-клеток; индукция продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и того и другого; индукция клиренса апоптических нейронов; пониженная экспрессия ФНО- α ; фосфорилирование SYK; повышенная экспрессия CD83 и/или CD86 на дендритных клетках; пониженная секреция одного или более воспалительных цитокинов; пониженная экспрессия одного или более воспалительных рецепторов; повышенная выживаемость и/или функция дендритных клеток, макрофагов и/или клеток микроглии; повышенный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; пониженный фагоцитоз макрофагами, дендритными клетками и/или микроглией при наличии нормальных уровней МКСФ; повышенная активность одного или более TREM2-зависимых генов (например, ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) из семейства факторов транскрипции) с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники и/или описанного в данном документе; Например, антитела к TREM2 можно анализировать *in vitro* на фосфорилирование тирозина TREM2, DAP12 и/или ERK, путем анализа рекрутинга Syk и/или Zap70 к комплексу DAP12/TREM2, путем анализа активации ФИЗК, путем анализа индукции экспрессии противовоспалительных медиаторов (например, ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10) или CCR7, или путем анализа пониженной экспрессии провоспалительных медиаторов (например, ИЛ- β и ФНО) со стимуляцией TLR (например, ЛПС, CpG ДНК или зимозана). Пригодные анализы могут включать вестерн-блоттинг (например, для тирозин-фосфорилированного DAP12 или треонин/серин-фосфорилированных ФИЗК киназой субстратов), ИФА (например, для секретируемого интерлейкина или секреции цитокинов), FACS (например, для связывания антитела к TREM2 с TREM2), иммуноцитометрию (например, для тирозин-фосфорилированного DAP12 или треонин/серин-фосфорилированных ФИЗК киназой субстратов), анализы гена-репортера (например, для активации TLR), увеличенную выживаемость и/или функцию клеток микроглии, дендритных клеток, моноцитов и/или макрофагов, увеличенный фагоцитоз апоптотических нейронов, поврежденных синапсов, А бета и/или другого клеточного дебриса макрофагами, дендритными клетками, остеокластами и/или клетками микроглии, повышенную реорганизацию цитоскелета и пониженные провоспалительные ответы микроглии или другие анализы, известные в данной области техники.

Некоторые аспекты настоящего описания обеспечивают антитела к DAP12, которые связываются с DAP12 человека или его гомологом, включая, но не ограничиваясь ими, белок DAP12 млекопитающего, белок DAP12 мыши (учетный номер UniProt Q99NH8), белок DAP12 крысы (учетный номер Uniprot D3ZZ89), белок DAP12 макаки-резус (учетный номер Uniprot F6QVF2), бычий белок DAP12 (учетный номер Uniprot Q05B59), лошадиный белок DAP12 (учетный номер Uniprot F7D6L0), свиной белок DAP12 (учетный номер Uniprot H2EZZ3) и собачий белок DAP12 (учетный номер Uniprot E2RP46); и индуцируют по меньшей мере одну активность DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна активность DAP12 представляет собой фосфорилирование DAP12, фосфорилирование TREM2, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов и/или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию связываются с белком DAP12 по настоящему описанию и/или вариантами естественного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 связываются с DAP12 человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию связываются с белком DAP12 по настоящему описанию, который экспрессируется на поверхности клетки, и индуцируют по меньшей мере одну активность DAP12 по настоящему описанию после связывания с экспрессированным на поверхности белком DAP12.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к DAP12 по настоящему описанию связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 22-40 DAP12 челове-

ка (SEQ ID NO: 2) или в пределах аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам 22-40 из SEQ ID NO: 2.

Константы диссоциации (K_D) антител к DAP12 для DAP12 человека и DAP12 мыши могут быть менее чем 10 нМ, менее чем 9,5 нМ, менее чем 9 нМ, менее чем 8,5 нМ, менее чем 8 нМ, менее чем 7,5 нМ, менее чем 7 нМ, менее чем 6,5 нМ, менее чем 6 нМ, менее чем 5,9 нМ, менее чем 5,8 нМ, менее чем 5,75 нМ, менее чем 5,7 нМ, менее чем 5,6 нМ, менее чем 5,5 нМ, менее чем 5,4 нМ, менее чем 5,3 нМ, менее чем 5,2 нМ, менее чем 5,1 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 4,5 нМ, менее чем 4 нМ, менее чем 3,5 нМ, менее чем 3 нМ, менее чем 2,5 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1,5 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,95 нМ, менее чем 0,9 нМ, менее чем 0,85 нМ, менее чем 0,8 нМ, менее чем 0,75 нМ, менее чем 0,7 нМ, менее чем 0,65 нМ, менее чем 0,6 нМ, менее чем 0,55 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,45 нМ, менее чем 0,4 нМ, менее чем 0,35 нМ, менее чем 0,3 нМ, менее чем 0,25 нМ, менее чем 0,2 нМ, менее чем 0,15 нМ, менее чем 0,1 нМ, менее чем 0,095 нМ, менее чем 0,09 нМ, менее чем 0,085 нМ, менее чем 0,08 нМ, менее чем 0,075 нМ, менее чем 0,07 нМ, менее чем 0,065 нМ, менее чем 0,06 нМ, менее чем 0,055 нМ или менее чем 0,05 нМ. Константы диссоциации могут быть определены с помощью любого аналитического метода, включая любой биохимический или биофизический метод, такой как ИФА, поверхностного плазмонный резонанс (ППР), биослойная интерферометрия (см, например, Octet System by ForteBio), изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), круговой дихроизм (КД), анализ методом остановленной струи и колориметрический и флуоресцентный анализы плавления белка.

Дополнительные антитела к DAP12, например антитела, которые специфически связываются с белком DAP12 по настоящему описанию, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу, или охарактеризованы относительно их физических/химических свойств и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники.

Биспецифические антитела.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к биспецифическим антителам, которые связываются как с TREM2, так и с DAP12 белками по настоящему описанию. Способы получения биспецифических антител хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифические антитела по настоящему описанию связываются с одним или более аминокислотными остатками из TREM2 человека (SEQ ID NO: 1) или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации изобретения антитела по настоящему описанию связываются с одним или более аминокислотными остатками DAP12 человека (SEQ ID NO: 2) или аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифические антитела по настоящему описанию распознают первый антиген и второй антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения первый антиген представляет собой TREM2 человека или его вариант естественного происхождения, или DAP12 человека, или его вариант естественного происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения второй антиген представляет собой болезнетворный белок, выбранный из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ПДП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR). В некоторых вариантах реализации изобретения второй антиген представляет собой специфический по отношению к гематоэнцефалическому барьеру белок, выбранный из рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1; или лигандов и/или белков, экспрессируемых иммунными клетками, причем лиганды и/или белки, выбраны из группы, состоящей из: CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG и фосфатидилсерина. В альтернативном варианте второй антиген может быть, без ограничений, белком, экспрессируемым на одной или более опухолевых клетках.

Фрагменты антител.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к фрагментам антител, которые связываются с одним или более белками человека, выбранными из TREM2 человека, естественного происхождения TREM2 человека, варианта TREM2 человека при патологии, DAP12 человека и естественного происхождения DAP12 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела используют в комбинации с одним или более антителами, которые специфически связываются с болезнетворным белком, выбранный из: бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитони-

на, супероксиддисмутаза, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медина, пролактин, транстиретин, лизоцим, бета-2-микроглобулин, гельзолин, кератоэпителин, цистатин, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA), пептидов повтора пролин-аргинин (PR) и любой их комбинации, и/или одного или более антител, которые специфически связывают связанный с раком белок, выбранный из: CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG, фосфатидилсерин и любой их комбинации.

Каркасы антител.

Любые из антител, описанные в данном документе, дополнительно включают каркас. В некоторых вариантах реализации изобретения каркас представляет собой каркас иммуноглобулина человека. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения антитело (например, антитело к TREM2) содержит HVR согласно любому из вышеуказанных вариантов реализации изобретения и дополнительно содержит акцепторный каркас человека, например каркас иммуноглобулина человека или консенсусный каркас человека. Каркасы иммуноглобулина человека могут быть частью антитела человека, или антитело, не являющееся человеческим, может быть гуманизировано путем замены одного или более эндогенных каркасов на каркасную(ые) область(и) человека. Каркасные области человека, которые могут быть использованы для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием способа "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, происходящие от консенсусной последовательности антител человека конкретной 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 (содержащие соматические мутации) каркасные области человека или эмбриональные каркасные области человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные при скрининге 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)).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 по настоящему описанию и одну, две, три или четыре каркасные области тяжелой цепи, как показано на фиг. 2B и/или фиг. 20A. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 HVR-L3 по настоящему описанию и одну, две, три или четыре каркасные области легкой цепи, как показано на фиг. 2C и/или фиг. 20B. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 по настоящему описанию и одну, две, три или четыре каркасные области тяжелой цепи, как показано на фиг. 2B и/или фиг. 20A и дополнительно содержит переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 HVR-L3 по настоящему описанию и одну, две, три или четыре каркасные области легкой цепи, как показано на фиг. 2C и/или фиг. 20B.

Связывание и фосфорилирование TREM2 и/или DAP12 В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать связывание TREM2 с DAP12 и/или связывание DAP12 с TREM2. В других вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать фосфорилирование TREM2 после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12. В других вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать фосфорилирование DAP12 после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12. В других вариантах реализации изобретения TREM2-опосредованное фосфорилирование TREM2 и/или DAP12 индуцируется одной или более тирозинкиназами семейства SRC. Примеры тирозинкиназ семейства Src включают, без ограничений, Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn и Frk.

DAP12 известен под такими названиями, как связывающий протеин-тирозинкиназу белок 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 реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать фосфорилирование DAP12 в его мотив ITAM. Для определения фосфорилирования белка, например, фосфорилирования DAP12, может быть использован любой способ, известный в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения DAP12 фосфорилируется киназами семейства SRC, что приводит к рекрутингу и активации киназы Syk, киназы ZAP70 или и той и другой к DAP12. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут рекрутировать Syk, ZAP70 или и ту и другую к комплексу DAP12/TREM2.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему

описанию могут быть использованы для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями активности DAP12, фосфорилированием DAP12 или рекрутированием Syk, ZAP70 или той и другой к комплексу DAP12/TREM2, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Активация ФИЗК.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать активацию ФИЗК после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

ФИЗК представляют собой семейство родственных внутриклеточных киназ переносчиков сигналов, способный фосфорилировать гидроксильную группу инозитольного кольца фосфатидилинозитола в положении 3 (PtdIns). Семейство ФИЗК подразделяется на три различных класса (класса I, класса II и класса III) на основе первичной структуры, регуляции и специфичности липидного субстрата *in vitro*.

Активированный ФИЗК производит различные 3-фосфорилированные фосфоинозитиды, включая, не ограничиваясь ими, PtdIns3P, PtdIns(3,4) P2, PtdIns(3,5)P2 и PtdIns (3,4,5)P3. Эти 3-фосфорилированные фосфоинозитиды функционируют в механизме, с помощью которого сигнальные белки рекрутируются в различные клеточные мембраны. Эти сигнальные белки содержат фосфоинозитид-связывающие домены, включая, не ограничиваясь ими, PX домены, плекстрин-гомологичные домены (домены PH) и домены FYVE. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для определения активации ФИЗК.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями активности ФИЗК, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Повышенная экспрессия противовоспалительных медиаторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию имеют противовоспалительную активность в головном мозге после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12. Согласно недавно полученной информации TREM2 имеет противовоспалительную функцию в головном мозге. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию повышают экспрессию противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов) и/или снижают экспрессию провоспалительных медиаторов после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

"Воспаление" представляет собой часть комплексной биологической реакции сосудистых тканей на вредные стимулы, такие как патогены, поврежденные клетки и раздражающие вещества. Классическими признаками острого воспаления являются боль, повышение температуры, краснота, припухлость и снижение функции. Воспаление представляет собой защитную попытку организма удалить вредные стимулы и начать процесс заживления. Воспаление может быть классифицировано как острое воспаление или хроническое воспаление. "Острое воспаление" представляет собой начальную реакцию тела на вредные стимулы и обеспечивается усилением притока плазмы и лейкоцитов (особенно гранулоцитов) из крови в поврежденные ткани. Каскад биохимических событий распространяет и развивает воспалительную реакцию, вовлекая локальную сосудистую систему, иммунную систему и различные клетки в пределах поврежденной ткани. Хроническое воспаление представляет собой длительное воспаление, которое приводит к прогрессирующему сдвигу в типах клеток, присутствующих в очаге воспаления, и характеризуется одновременным уничтожением и излечиванием ткани от воспалительного процесса.

В данном контексте противовоспалительные медиаторы представляют собой белки, участвующие напрямую или косвенно (например, с помощью противовоспалительного сигнального пути) в механизме, который снижает, ингибирует или инактивирует воспалительную реакцию. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для идентификации и характеристики противовоспалительных медиаторов. Примеры противовоспалительных медиаторов включают, не ограничиваясь ими, цитокины, такие как ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут повышать экспрессию противовоспалительных медиаторов, таких как ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная экспрессия противовоспалительных медиаторов происходит в макрофагах, дендритных клетках и/или клетках микроглии. Повышенная экспрессия может включать, не ограничиваясь ими, увеличение экспрессии генов, увеличение транскрипционной экспрессии или увеличение экспрессии белка. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для определения экспрессии гена, транскрипта (например, мРНК) и/или белка. Например, Нозерн-блоттинг может быть использован для определения уровня экспрессии гена противовоспалительного медиатора, ОТ-ПЦР может быть использована для определения уровня транскрипции противовоспалительного медиатора, и Вестерн-блоттинг может быть использован

для определения уровней белка противовоспалительного медиатора.

В данном контексте противовоспалительный медиатор может иметь повышенную экспрессию, если его экспрессия в одной или более клетках субъекта, получающего лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12 по настоящему описанию, является большей, чем экспрессия такого же противовоспалительного медиатора, экспрессируемого в одной или более клетках соответствующего субъекта, не получающего лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию может повышать экспрессию противовоспалительного медиатора в одной или более клетках субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению с экспрессией противовоспалительного медиатора в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию повышает экспрессию противовоспалительного медиатора в одной или более клетках субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раз, по меньшей мере в 2,1 раз, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раз, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раз, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раз, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раз, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раз, по меньшей мере в 3,5 раз, по меньшей мере в 4,0 раз, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, по сравнению с экспрессией противовоспалительного медиатора в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12.

Без ограничения теории полагают, что в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются пригодными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями одного или более противовоспалительных медиаторов, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Пониженная экспрессия провоспалительных медиаторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут снижать экспрессию провоспалительных медиаторов после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

В данном контексте провоспалительные медиаторы представляют собой белки, участвующие напрямую или косвенно (например, с помощью провоспалительных сигнальных путей) в механизме, который индуцирует, активирует, способствует или, иным образом, увеличивает воспалительную реакцию. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для идентификации и характеристики провоспалительных медиаторов. Примеры провоспалительных медиаторов включают, без ограничений, цитокины, такие как ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ- 1β , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-12, p70, ИЛ-8, СРБ, ФНО, члены семейств белков хемокинов ТФР-бета, члены семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут снижать функциональную экспрессию и/или секрецию провоспалительных медиаторов, таких как ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ- 1β , ФНО, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ. В некоторых вариантах реализации изобретения сниженная экспрессия провоспалительных медиаторов происходит в макрофагах, дендритных клетках, моноцитах, остеокластах, клетках Лангерганса кожи, клетках Купфера и/или клетках микроглии. Сниженная экспрессия может включать, не ограничиваясь ими, снижение экспрессии генов, снижение транскрипционной экспрессии или снижение экспрессии белка. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для определения экспрессии гена, транскрипта (например, мРНК) и/или белка. Например, Нозерн-блоттинг может быть использован для определения уровней экспрессии гена провоспалительного медиатора, ОТ-ПЦР может быть использована для определения уровня

транскрипции провоспалительного медиатора, и Вестерн-блоттинг может быть использован для определения уровней белка провоспалительного медиатора.

В некоторых вариантах реализации изобретения провоспалительные медиаторы включают воспалительные цитокины. Соответственно в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут уменьшать секрецию одного или более воспалительных цитокинов. Примеры воспалительных цитокинов, чья секреция может быть уменьшена за счет антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию, включают, не ограничиваясь ими, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН- α 4, ИФН-6, ИЛ-1 β , ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17 и ИЛ-18.

В некоторых вариантах реализации изобретения провоспалительные медиаторы включают воспалительные рецепторы. Соответственно в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут уменьшать экспрессию одного или более воспалительных рецепторов. Примеры воспалительных рецепторов, чья секреция может быть уменьшена за счет антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию, включают, не ограничиваясь им, CD86.

В данном контексте провоспалительный медиатор может иметь сниженную экспрессию, если его экспрессия в одной или более клетках субъекта, получающего лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12 по настоящему описанию, является меньшей, чем экспрессия такого же провоспалительного медиатора, экспрессируемого в одной или более клетках соответствующего субъекта, не получающего лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может снижать экспрессию провоспалительного медиатора в одной или более клетках субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению с экспрессией провоспалительного медиатора в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 может снижать экспрессию провоспалительного медиатора в одной или более клетках субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раз, по меньшей мере в 2,1 раз, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раз, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раз, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раз, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раз, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раз, по меньшей мере в 3,5 раз, по меньшей мере в 4,0 раз, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, по сравнению с экспрессией провоспалительного медиатора в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12.

Без ограничения теорией полагают, что некоторые антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут быть пригодными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с увеличенными уровнями одного или более провоспалительных медиаторов, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хаккола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Фосфорилирование ERK.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать фосфорилирование регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) после связывания с экспрессируемым в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

Киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK), представляют собой широко экспрессируемые внутриклеточные сигнальные протеинкиназы, которые участвуют, например, в регулировании мейоза, митоза и постмитотических функций в дифференцированных клетках. Различные стимулы, такие как факторы роста, цитокины, вирусные инфекции, лиганды для гетеротримерных, связанных с G-белком рецепторов, трансформирующие агенты и канцерогены активируют пути ERK. Фосфорилирова-

ние ERK приводит к активации их киназной активности.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями фосфорилирования ERK, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хаккола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Повышенная экспрессия С-С хемокинового рецептора 7.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут увеличивать экспрессию С-С хемокинового рецептора 7 (CCR7) после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12. Повышенная экспрессия может включать, не ограничиваясь ими, увеличение экспрессии генов, увеличение транскрипционной экспрессии или увеличение экспрессии белка. Может быть использован любой способ, известный в данной области техники, для определения экспрессии гена, транскрипта (например, мРНК) и/или белка. Например, Нозерн-блоттинг может быть использован для определения уровней экспрессии гена противовоспалительного медиатора, ОТ-ПЦР может быть использована для определения уровня транскрипции противовоспалительного медиатора, и Вестерн-блоттинг может быть использован для определения уровней белка противовоспалительного медиатора.

С-С хемокиновый рецептор 7 (CCR7) является членом семейства рецепторов, связанных с G-белком. CCR7 экспрессируется в различных лимфоидных тканях и может активировать В-клетки и Т-клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения CCR7 может модулировать миграцию памяти Т-клеток к вторичным лимфоидным органам, таким как лимфатические узлы. В других вариантах реализации изобретения CCR7 может стимулировать созревание дендритных клеток. CCR7 представляет собой белок-рецептор, который может связать хемокиновые (С-С мотив) лиганды CCL19/ELC и CCL21.

В данном контексте CCR7 может иметь повышенную экспрессию, если его экспрессия в одной или более клетках субъекта, получающего лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12 по настоящему описанию, является большей, чем экспрессия CCR7, экспрессируемого в одной или более клетках соответствующего субъекта, не получающего лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию может повышать экспрессию CCR7 в одной или более клетках субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению с экспрессией CCR7 в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию повышает экспрессию CCR7 в одной или более клетках субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раза, по меньшей мере в 2,1 раза, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4,0 раза, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раза, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раза, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, по сравнению с экспрессией CCR7 в одной или более клетках соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12.

В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная экспрессия CCR7 происходит в макрофагах, дендритных клетках и/или клетках микроглии. Повышенная экспрессия CCR7 может вызвать хемотаксис клеток микроглии в сторону клеток, экспрессирующих хемокины CCL19 и CCL21. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать хемотаксис клеток микроглии в сторону клеток, экспрессирующих CCL19 и CCL21.

Без ограничения теорией полагают, что в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются пригодными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями CCR7, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хаккола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или

рассеянный склероз.

Усиление или нормализация способности дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут усилить и/или нормализовать способность дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может усилить и/или нормализовать способность дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток в одной или более дендритных клетках костного мозга субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению со способностью дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток в одной или более дендритных клетках костного мозга соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 может усилить и/или нормализовать способность дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток в одной или более дендритных клетках костного мозга субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раза, по меньшей мере в 2,1 раза, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4,0 раза, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раза, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, по сравнению со способностью дендритных клеток костного мозга индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток в одной или более дендритных клетках костного мозга соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12.

Без ограничения теории полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с повышенной или дисрегулируемой способностью индуцировать антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Продуцирование остеокластов.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать продуцирование остеокластов и/или повышать скорость остеокластогенеза после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

В данном контексте остеокласт представляет собой тип костной клетки, которая может удалить костную ткань путем удаления минерализованной матрицы и разрушение органической кости (например, атрофия кости). Остеокласты могут быть образованы путем слияния клеток моноцитарно-макрофагальной клеточной линии. В некоторых вариантах реализации изобретения остеокласты могут характеризоваться высокой экспрессии тартратрезистентной кислотой фосфатазы (TRAP) и катепсина К.

В данном контексте скорость остеокластогенеза может быть повышенной, если скорость остеокластогенеза субъекта, получающего лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12 по настоящему описанию, является большей, чем скорость остеокластогенеза соответствующего субъекта, не получающего лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может увеличить скорость остеокластогенеза субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на

60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению со скоростью остеокластогенеза соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения агонистическое антитело к TREM2 и/или агонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может увеличить скорость остеокластогенеза субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раз, по меньшей мере в 2,1 раз, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раз, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раз, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раз, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раз, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раз, по меньшей мере в 3,5 раз, по меньшей мере в 4,0 раз, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, например, по сравнению со скоростью остеокластогенеза соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12.

В данном контексте скорость остеокластогенеза может быть сниженной, если скорость остеокластогенеза субъекта, получающего лечение антагонистическим антителом к TREM2 и/или антагонистическим антителом к DAP12 по настоящему описанию, является меньшей, чем скорость остеокластогенеза соответствующего субъекта, не получающего лечения антагонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело к TREM2 и/или антагонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может снизить скорость остеокластогенеза субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению со скоростью остеокластогенеза соответствующего субъекта, который не получал лечение антагонистическим антителом к TREM2 и/или антагонистическим антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения антагонистическое антитело к TREM2 и/или антагонистическое антитело к DAP12 по настоящему описанию может уменьшить скорость остеокластогенеза субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раз, по меньшей мере в 2,1 раз, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раз, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раз, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раз, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раз, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раз, по меньшей мере в 3,5 раз, по меньшей мере в 4,0 раз, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, например, по сравнению со скоростью остеокластогенеза соответствующего субъекта, который не получал лечение агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с сокращением продуцирования остеокластов и/или скорости остеокластогенеза, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз; или связанных с патологическим формированием и поддержанием кости, включая остеопороз, который связан с патологическим снижением плотности костной ткани и остеопоротическими заболеваниями, которые связаны с патологическим увеличением плотности костной ткани.

Пролиферация и выживание макрофагов, клеток микроглии, дендритные клетки, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по на-

стоящему описанию могут повышать пролиферацию, выживаемость и/или функцию макрофагов, клеток микроглии (микроглии), моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

Клетки микроглии представляют собой тип глиальных клеток, которые являются резидентными макрофагами головного и спинного мозга, и, таким образом, выступают в качестве первой и основной формы активной иммунной защиты в центральной нервной системе (ЦНС). Клетки микроглии составляют 20% от общей численности глиальных клеток в головном мозге. Клетки микроглии непрерывно очищают ЦНС для бляшек, поврежденных нейронов и инфекционных агентов. Головной мозг и спинной мозг считаются "иммунопривилегированными" органами по той причине, что они отделены от остального тела посредством ряда эндотелиальных клеток, известных как гематоэнцефалический барьер, который предотвращает проникновение большинства инфекций в уязвимую нервную ткань. В случае, когда инфекционные агенты непосредственно вводят в мозг или проходят через гематоэнцефалический барьер, клетки микроглии должны реагировать быстро, чтобы уменьшить воспаление и уничтожить инфекционные агенты, прежде чем они повреждают чувствительную нервную ткань. Из-за недоступности антител из остального тела (небольшое количество антител имеют достаточно малый размер, чтобы пройти через гематоэнцефалический барьер) микроглия должна иметь возможность распознать инородные тела, поглотить их и действовать в качестве антиген-представляющих клеток, активирующих Т-клетки. Поскольку этот процесс должен быть осуществлен быстро, чтобы предотвратить потенциально смертельный урон, клетки микроглии чрезвычайно чувствительны к даже небольшим патологическим изменениям в ЦНС. Они достигают этой чувствительности помимо всего прочего благодаря наличию уникальных калиевых каналов, которые отвечают даже на небольшие изменения концентрации внеклеточного калия.

В данном контексте макрофаги по настоящему описанию включают, не ограничиваясь ими, макрофаги M1, активированные макрофаги M1, и макрофаги M2. В данном контексте макрофаги по настоящему описанию включают, не ограничиваясь ими, клетки микроглии M1, активированные клетки микроглии M1 и клетки микроглии M2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут повышать экспрессию CD83 и/или CD86 в моноцитах дендритных клеток, моноцитах и/или макрофагах.

В данном контексте скорость пролиферация, выживаемость и/или функция макрофагов микроглии, моноцитов и/или дендритных клеток может включать повышенную экспрессию, если скорость пролиферации, выживаемость и/или функция макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера субъекта, получающего лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12 по настоящему описанию, является большей, чем скорость пролиферации, выживаемость и/или функция макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера соответствующего субъекта, не получающего лечения агонистическим антителом к TREM2 и/или агонистическим антителом к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию может увеличить скорость пролиферации, выживаемость и/или функцию макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 115%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 125%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 135%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 145%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190% или по меньшей мере на 200%, например, по сравнению со скоростью пролиферации, выживаемостью и/или функцией макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12. В других вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию может увеличить скорость пролиферации, выживаемость и/или функцию макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера субъекта по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2,0 раз, по меньшей мере в 2,1 раз, по меньшей мере в 2,15 раз, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,25 раз, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,35 раз, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,45 раз, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,55 раз, по меньшей мере в 3,0 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4,0 раза, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5,0 раз, по меньшей мере в 5,5 раз, по меньшей мере в 6,0 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7,0 раз, по меньшей мере в 7,5 раза, по меньшей мере в 8,0 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9,0 раз, по меньшей мере в 9,5 раз или по меньшей мере в 10 раз, например, по

сравнению со скоростью пролиферации, выживаемостью и/или функцией макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера соответствующего субъекта, который не получал лечение антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных со снижением пролиферации, выживаемости и/или функции макрофагов, микроглии, моноцитов дендритных клеток, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Клиренс и фагоцитоз.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать клиренс и/или фагоцитоз после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12 одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани нервной системы, дебриса не нервной ткани нервной системы, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов и/или болезнетворных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации изобретения болезнетворные белки включают, не ограничиваясь ими, бета-амилоид или его фрагменты, Tau, IAPP, альфа-синуклеин, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионный белок PrPsc, хантингтин, кальцитонин, супероксиддисмутазу, атаксин, телца Леви, атриальный натрийуретический пептид, островковый амилоидный полипептид, инсулин, аполипопротеин AI, сывороточный амилоид A, медин, пролактин, транстиретин, лизоцим, бета-2-микроглобулин, гельзолин, кератоэпителин, цистатин, легкая цепь иммуноглобулина AL, белок S-IBM, продукты трансляции, ассоциированные с повторами не ATG (RAN), пептиды дипептидного повтора (ДПП), пептиды повтора глицин-аланин (GA), пептиды повтора глицин-пролин (GP), пептиды повтора глицин-аргинин (GR), пептиды повтора пролин-аланин (PA) и пептиды повтора пролин-аргинин (PR). В некоторых вариантах реализации изобретения болезнетворная нуклеиновая кислота включает, без ограничений, бессмысловую РНК экспансию повторов GGCCCC (G2C4).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать один или более типов клиренса, включая, без ограничений, клиренс апоптотических нейронов, клиренс дебриса нервной ткани, клиренс дебриса не нервной ткани, клиренс бактерий или других инородных тел, клиренс болезнетворного белка, клиренс болезнетворного пептида и клиренс болезнетворной нуклеиновой кислоты и клиренс раковых клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать фагоцитоз одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов, болезнетворных нуклеиновых кислот и/или раковых клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут повышать фагоцитоз макрофагов, дендритных клеток, моноцитов и/или микроглии в условиях пониженных уровней макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ). В альтернативном варианте в некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут снижать фагоцитоз макрофагов, дендритных клеток, моноцитов и/или микроглии при наличии нормальных уровней макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ).

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с апоптотическими нейронами, дебрисом нервной ткани нервной системы, дебрисом не нервной ткани нервной системы, бактериями, другими инородными телами или болезнетворными белками, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Фосфорилирование Syk.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут индуцировать фосфорилирование тирозинкиназы селезенки (Syk) после связывания с экспрессированным в клетке белком TREM2 и/или белком DAP12.

Тирозинкиназа селезенки (Syk) является внутриклеточной сигнальной молекулой, которая функционирует после TREM2 в метаболическом пути путем фосфорилирования нескольких субстратов, таким образом, способствуя формированию сигнального комплекса, который приводит к клеточной активации и воспалительным процессам.

Без ограничения теорией полагают, что антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями фосфорилирования Syk, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсо-

на, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

TREM2-зависимая генная экспрессия.

В некоторых вариантах реализации изобретения агонистические антитела к TREM2 и/или агонистические антитела к DAP12 по настоящему описанию могут повышать активность и/или экспрессию TREM2-зависимых генов, таких как один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT) из семейства факторов транскрипции. В альтернативном варианте антагонистические антитела к TREM2 и/или антагонистические антитела к DAP12 по настоящему описанию могут ингибировать активность и/или экспрессию TREM2-зависимых генов, таких как один или более факторов транскрипции из семейства NFAT факторов транскрипции.

Без ограничения теорией полагают, что агонистические антитела к TREM2 и/или агонистические антитела к DAP12 по настоящему описанию являются эффективными для предотвращения, снижения риска или лечения патологических состояний и/или заболеваний, связанных с пониженными уровнями TREM2-зависимых генов, включая деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию и/или рассеянный склероз.

Приготовление антител.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут включать в себя поликлональные антитела, моноклональные антитела, гуманизированные и химерные антитела, человеческие антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и F(ab')₂), биспецифические и полиспецифические антитела, мультвалентные антитела, антитела, полученные из библиотеки, антитела, имеющие модифицированные эффекторные функции, слитые белки, содержащие часть антитела, и любая другая модифицированная конфигурация молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена, такой как эпитоп, имеющий аминокислотные остатки белка TREM2 и/или DAP12 по настоящему описанию, включая гликозилированные варианты антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 могут иметь происхождение от человека, мыши, крысы или какое-либо другое происхождение (включая химерные или гуманизированные антитела).

(1) Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела, такие как поликлональные антитела к TREM2 и/или поликлональные антитела к DAP12, как правило, вырабатываются у животных путем множественных подкожных (п/к) или внутривенных (в/в) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование соответствующего антигена (например, очищенный или рекомбинантный белок TREM2 и/или очищенный или рекомбинантный белок DAP12 по настоящему описанию) с белком, который является иммуногенным для иммунизируемых видов, например, с гемоцианином моллюска фиссуреллии (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои, с использованием бифункционального или дериватизирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимиды (конъюгирование через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl₂ или R¹N=C=NR, где R и R¹ представляют собой разные алкильные группы. Примеры адъювантов, которые могут быть использованы, включают полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфориллипид А, синтетический дикориномиколат трегалозы).

Протокол иммунизации может быть выбран специалистом в данной области техники без лишних экспериментов.

Животных иммунизируют против желаемого антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг (для кроликов) или 5 мкг (для мышей) белка или конъюгата с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъекцией этого раствора внутривенно во множественных участках. Спустя месяц животных повторно иммунизируют (бустер-иммунизацией) 1/5-1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда подкожной инъекцией во множественных участках. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку в отношении титра антител. Животных повторно иммунизируют, пока не получают плато титра. Конъюгаты могут быть также получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. Также агрегирующие агенты, такие как квасцы, являются пригодными для усиления иммунного ответа.

(2) Моноклональные антитела.

Моноклональные антитела, такие как моноклональные антитела к TREM2 и/или моноклональные антитела к DAP12 получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие эту популяцию, являются идентичными за исключением возможных мутаций естественного происхождения и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в минорных количествах. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на характер антитела, как не являющегося смесью дискретных антител.

Например, моноклональные антитела к TREM2 и/или моноклональные антитела к DAP12 могут быть получены с использованием гибридомного способа, впервые описанного Köhler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК (патент США № 4816567).

В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, как описано выше, для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, использованным для иммунизации (например, очищенный или рекомбинантный белок TREM2 и/или очищенный или рекомбинантный белок DAP12 по настоящему описанию). В альтернативном варианте лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, такой как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Как правило, иммунизирующий агент будет включать антигенный белок (например, очищенный или рекомбинантный белок TREM2 и/или очищенный или рекомбинантный белок DAP12 по настоящему описанию) или его слитый вариант. Как правило, если желательным источником является млекопитающее, не являющееся человеком, используют клетки селезенки или клетки лимфатического узла либо, если желательными являются клетки человеческого происхождения, используются лимфоциты периферической крови ("PBL"). Чтобы получить гибридную клетку, лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией, используя подходящий агент слияния, такой как полиэтиленгликоль. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Как правило, иммортализованные клеточные линии представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности клетки миеломы грызуна, быка или человека. Как правило, используются клеточные линии миеломы крысы или мыши. Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридомы обычно должна включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), и такие вещества предотвращают рост клеток с недостаточностью HGPRT.

Предпочтительными миеломными клетками являются такие клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают на стабильно высоком уровне продукцию антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к такой среде, как среда HAT. Среди них предпочтительными являются клеточные линии миеломы мыши, такие как линии, полученные из опухолей мыши MOPC-21 и MPC-11 (доступные из Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA), а также клетки SP-2 и их производные (например, X63-Ag8-653) (доступные из American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA). Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения моноклональных антител человека (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют в отношении продукции моноклональных антител, направленных против антигена (например, белка TREM2 и/или белка DAP12 по настоящему описанию). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, предпочтительно определяют с помощью иммунопреципитации или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Культуральная среда, в которой выращивают клетки гибридомы, может быть проанализирована в отношении наличия моноклональных антител, направленных против антигена (например, белка TREM2 и/или белка DAP12 по настоящему описанию). Аффинность связывания и специфичность моноклональных антител может быть определена с помощью иммунопреципитации или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ИФА). Такие методы известны в данной области техники. Например, аффинность связывания может быть определена с помощью анализа Скотчарда по Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы способами лимитирующего разведения и выращены стандартными способами (Goding, *supra*). Подходящие культуральные среды для указанной цели включают, например, среду D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки традиционными способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, хроматография с использованием протеина А-сефарозы, гидроксилапатита, гель-электрофорез, диализ, аффинная хроматография и другие способы, описанные выше.

Моноклональные антитела к TREM2 и/или моноклональные антитела к DAP12 также могут быть получены способами рекомбинантной ДНК, такими как способы, описанные в патенте США № 4816567 и как описанные выше. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют, используя обычные способы (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридо-

мы служат в качестве источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы получить синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии бактериальной ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plückerthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188 (1992).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных с использованием методов, описанных в McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описывают выделение мышиных и человеческих антител, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В последующих публикациях описано получение высокоаффинных (наномолярный ("нМ") диапазон) антител человека с помощью перетасовки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и рекомбинации *in vivo* в качестве стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, такие методы являются приемлемыми альтернативами традиционным способам на основе продуцирующих моноклональные антитела гибридом для выделения моноклональных антител (например, те, которые связывают белок TREM2 по настоящему описанию).

ДНК, кодирующая антитела или их фрагменты, может быть также модифицирована, например, путем замены последовательности, кодирующей константные домены тяжелой и легкой цепи вместо гомологичных мышиных последовательностей (патент США № 4816567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или ковалентным присоединением к кодирующей иммуноглобулин последовательности всей или части последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид. Обычно такими неиммуноглобулиновыми полипептидами заменяют константные домены антитела или ими заменяют переменные домены одного антигенсвязывающего участка антитела, чтобы создать гибридное бивалентное антитело, содержащее один антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность по отношению к антигену, и другой антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность по отношению к другому антигену.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, (например, антитела к TREM2 и/или антитела DAP12 по настоящему описанию или их фрагменты) могут быть моновалентными, получение которых хорошо известно в данной области техники. Например, один метод включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи и модифицированной тяжелой цепи иммуноглобулина. Тяжелую цепь, как правило, укорачивают в любой точке Fc-области для предотвращения перекрестного сшивания тяжелой цепи. В альтернативном варианте релевантные остатки цистеина могут быть заменены другим аминокислотным остатком или удалены для предотвращения перекрестного сшивания. Способы *in vitro* также пригодны для получения моноклональных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в частности фрагментов Fab, можно осуществить с использованием обычных методов, известных в данной области техники.

Химерные или гибридные антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 также могут быть получены *in vitro* с использованием известных способов в химии синтетических белков, включая способы с использованием перекрестно сшивающих агентов. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с помощью реакции дисульфидного обмена или путем формирования простой тиоэфирной связи. Примеры приемлемых для этой цели реагентов включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

(3) Гуманизированные антитела.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию или фрагменты соответствующих антител могут дополнительно включать гуманизированные или антитела человека.

Гуманизированные формы не являющихся человеческими антител (например, мышиных) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из не являющегося человеческим иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками отличных от человека видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки из области рамки считывания Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, не совпадающими с человеческими. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не присутствуют ни в антителе реципиента, ни в импортированной CDR или последовательностях каркасных участков. Обычно гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, чаще двух переменных доменов, в которых все или практически все области CDR соответствуют таковым в не являющемся человеческим иммуноглобулине, а все или практически все области FR представляют собой области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Предпочтительно, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере участок константной области иммуноглобулина (Fc), обычно

константной области 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).

В данной области хорошо известны способы гуманизации антител к TREM2 и/или антител к DAP12. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более аминокислотных остатков, введенных из источника, не являющегося человеком. Эти не совпадающие с человеческими аминокислотные остатки часто называют "импортируемыми" остатками, которые обычно получают из "импортируемого" переменного домена. В целом гуманизацию можно осуществлять, согласно способу Winter и сотрудников, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988) или путем замены CDR грызунов или CDR последовательностей соответствующими последовательностями антитела человека. Таким образом, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), в которых по существу менее, чем один интактный переменный домен человека, был заменен соответствующей последовательностью из вида не человека. На практике гуманизированные антитела являются обычно антителами человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков в антителах грызуна.

Выбор переменных доменов, как легкой, так и тяжелой цепи, человека, для использования в получении гуманизированных антител является очень важным для уменьшения антигенности. Согласно так называемому способу "оптимальной подгонки" последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу по сравнению с полной библиотекой известных последовательностей переменных доменов человека. Человеческую последовательность, которая наиболее близка последовательности грызуна, затем берут в качестве человеческого каркаса (FR) для гуманизированного антитела. Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). В другом способе используют особый каркас, полученный из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас 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).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности по отношению к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения указанной цели, в соответствии с предпочтительным способом, гуманизированные антитела получают, проводя анализ исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и показывают возможные трехмерные конформационные структуры отобранных для исследования последовательностей иммуноглобулина. Исследование таких изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании отобранной для исследования последовательности иммуноглобулина, т.е. анализировать остатки, которые влияют на способность отобранного для исследования иммуноглобулина связывать соответствующий ему антиген. Таким образом могут быть отобраны и объединены остатки FR из реципиентных и импортируемых последовательностей так, чтобы добиться требуемых характеристик антитела, таких как повышенная аффинность по отношению к антигену(нам)-мишени(ням) (например, белки TREM2 по настоящему описанию). В общем, остатки CDR непосредственно и в наибольшей степени влияют на связывание антигена.

Рассматриваются различные формы гуманизированного антитела к TREM2 и/или гуманизированного антитела к DAP12. Например, гуманизированное антитело к TREM2 и/или гуманизированное антитело к DAP12 может представлять собой фрагмент антитела, такой как Fab, который необязательно конъюгирован с одним или более лигандами TREM2, таким как HSP60. В альтернативном варианте гуманизированное антитело к TREM2 и/или гуманизированное антитело к DAP12 может быть интактным антителом, таким как интактное антитело к IgG1.

(4) Антитела человека.

В альтернативном варианте антитела человека к TREM2 и/или антитела человека к DAP12 могут быть получены. В настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей) которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Гомозиготная делеция гена соединяющей области тяжелой цепи (J_H) антитела у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в таких мутантных по зародышевой линии мышей должен приводить к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, 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 № 5591669 и WO 97/17852.

В альтернативном варианте для получения антител человека к TREM2 и/или антител человека к DAP12 и фрагментов антител *in vitro* может быть использован метод фагового дисплея с использованием репертуаров генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов от неиммунизированных доноров.

McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991). Согласно указанному методу гены V-доменов антител клонируют в рамке считывания с геном либо основного, либо минорного белка оболочки нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и выводят в виде функциональных фрагментов антител на поверхность фаговой частицы. Поскольку нитчатая частица содержит одноцепочечную копию ДНК фагового генома, селекция на основе функциональных свойств антитела также приводит к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клетки. Фаговый дисплей может быть выполнен во многих форматах, обзор которых приведен в, например, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Curr. Opin Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников участков V-генов. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) выделили широкий спектр антител к оксазолону из небольшой случайной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенок иммунизированных мышей. Можно сконструировать репертуар V-генов неиммунизированных людей-доноров и можно выделить антитела к широкому спектру антигенов (включая аутоантигены), по существу следуя методу, описанному Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См. также патенты США № 5565332 и 5573905. Кроме того, метод дрожжевого дисплея может быть использован для получения антител человека к TREM2 и/или антител человека к DAP12 и фрагментов антител *in vitro* (например, WO 2009/036379; WO 2010/105256; WO 2012/009568; US 2009/0181855; US 2010/0056386; и Feldhaus and Siegel (2004) *J. Immunological Methods* 290:69-80). В других вариантах реализации изобретения метод дрожжевого дисплея может быть использован для получения антител человека к TREM2 и/или антител человека к DAP12 и фрагментов антител *in vitro* (например, Roberts and Szostak (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:12297-12302; Schaffitzel et al. (1999) *J. Immunological Methods* 231:119-135; Lipovsek and Plückthun (2004) *J. Immunological Methods* 290:51-67).

Методы Cole et al., и Boerner et al., также доступны для получения моноклональных антител человека к TREM2 и/или моноклональных антител человека к DAP12 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991). Аналогично антитела человека к TREM2 и/или антитела человека к DAP12 могут быть получены путем введения локусов иммуноглобулинов человека в трансгенным животным, например мышам, у которых гены эндогенных иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. При стимуляции наблюдается продукция антител человека, которые крайне сходны с антителами, выявляемыми у людей, во всех отношениях, включая перестройку генов, сборку и спектр антител. Этот подход описан, например, в патентах США № 5545807; 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016 и в следующих научных публикациях: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

И наконец, антитела человека к TREM2 и/или к DAP12 также могут быть получены путем активации В-клеток (см. патенты США № 5567610 и 5229275).

(5) Фрагменты антител.

В некоторых вариантах реализации изобретения есть преимущества использования фрагментов антитела к TREM2 и/или фрагментов антитела к DAP12, а не полных антител к TREM2 и/или полных антител к DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения меньший размер фрагмента создает возможность для быстрого клиренса и лучшего проникновения в мозг.

Были разработаны различные способы получения фрагментов антител. Традиционно такие фрагменты получали в результате протеолитического расщепления интактных антител (см, например, Morigimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Однако в настоящее время такие фрагменты могут непосредственно продуцироваться рекомбинантными клетками-хозяевами, например, с использованием нуклеиновых кислот, кодирующих антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию. Фрагменты антител Fab, Fv и scFv все могут быть экспрессированы и выделены из *E.coli*, тем самым обеспечивая прямое производство больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител к TREM2 и/или фрагменты антител к DAP12 могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. В альтернативном варианте фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно извлечены из клеток *E.coli* и химически связаны с образованием фрагментами F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Продукция фрагментов антител Fab и F(ab')₂ с повышенными периодами полувыведения *in vivo* описана в патенте США № 5869046. В других вариантах реализации изобретения выбранное антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (ScFv). См. WO 93/16185; патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Фрагмент антитела к TREM2 и/или фрагмент антитела к DAP12 также может быть "линейным антителом", например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

(6) Биспецифические и полиспецифические антитела.

Биспецифические антитела (BsAbs) являются антителами, которые имеют специфичности связывания в отношении по меньшей мере двух различных эпитопов, в том числе эпитопов на одном и том же

или на другом белке (например, один или более белков TREM2 по настоящему описанию). В альтернативном варианте одно плечо может быть сконструировано для связывания с целевым антигеном TREM2 и/или целевым антигеном DAP12, а другое плечо может быть объединено с плечом, которое связывает второй белок. Такие антитела могут быть произведены из полноразмерных антител или фрагментов антител (например, $F(ab')_2$ биспецифических антител).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелых цепей/легких цепей иммуноглобулина, где эти две пары цепей обладают различной специфичностью. Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983). Вследствие случайного расхождения генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) образуют потенциальную смесь из 10 разных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка этой правильной молекулы, которую обычно выполняют посредством стадий аффинной хроматографии, является довольно обременительной, выходы этого продукта являются низкими. Сходные процедуры описаны в WO 93/08829 и в Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом, вариабельные домены антитела с требуемой специфичностью связывания (сайтами связывания антитела с антигеном) являются слитыми с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Гибридизация предпочтительно происходит в константном домене тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащем по меньшей мере часть шарнирных, C_H2 и C_H3 , областей. Предпочтительно иметь первую константную область тяжелой цепи (C_H1), содержащую сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий в по меньшей мере одном из слияний. ДНК, кодирующие эти слияния тяжелых цепей иммуноглобулина и, если требуется, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в коррекции взаимных долей трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации изобретения, в которых неравные доли этих трех полипептидных цепей, используемых в этой конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако можно встраивать кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или, когда эти соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте реализации этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью в одном плече и гибридной пары тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине этих биспецифических молекул обеспечивает легкий путь отделения. Этот подход описан в WO 94/04690. В отношении дополнительных подробностей образования биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986); и Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 799-801 (2014).

В соответствии с другим подходом, описанным в WO 96/27011 или патенте США № 5731168, область контакта между парой молекул антител может быть сконструирована таким образом, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, которые извлекают из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная область контакта содержит по меньшей мере часть области C_H3 константного домена антитела. В этом способе одна или более малых боковых цепей аминокислот из области контакта молекулы первого антитела заменены большими боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). Компенсаторные "полости" идентичного или сходного размера относительно больших боковых цепей создаются на области контакта второй молекулы антитела путем замены больших аминокислотных боковых цепей меньшими (например, аланина или треонина). Это обеспечивает механизм для увеличения выхода этого гетеродимера относительно других, нежелательных, конечных продуктов, таких как гомодимеры.

В литературе были описаны способы генерирования биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела могут быть получены с использованием химической связи. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описывают процедуру, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют с генерированием фрагментов $F(ab')_2$. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии комплексирующего дитиола агента арсенита натрия для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные фрагменты Fab' превращают в тионитробензоатные (TNB) производные. Затем одно из производных Fab'-TNB повторно превращают в производное Fab'-TNB для образования биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Фрагменты Fab' могут быть непосредственно извлечены из *E.coli* и химически связаны с образованием биспецифических антител. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описывают образование полностью гуманизированных молекул $F(ab')_2$ биспецифического антитела. Каждый фрагмент Fab' отдельно секретировался из *E.coli* и подвергался направленному химическому связыванию *in vitro* с получением биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело было спо-

способно связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней опухоли молочной железы человека.

Были также описаны разнообразные способы получения и выделения бивалентных фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, были получены бивалентные гетеродимеры с использованием лейциновых молний. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun связывали с частями Fab' двух разных антител слиянием генов. Эти гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области для образования мономеров и затем повторно окисляли для образования гетеродимеров антител. Способ "диатела", описанный Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) обеспечил альтернативный механизм для получения биспецифических/бивалентных фрагментов антител. Эти фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы сделать возможное спаривание между этими двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с доменами V_L и V_H другого фрагмента с образованием посредством этого двух антигенсвязывающих сайтов. Сообщалась также другая стратегия для получения биспецифических/бивалентных фрагментов антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (sFv). См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Другой способ получения биспецифических антител представляет собой контролируемый обмен фрагментами Fab (сFAE), который является простым в использовании способом для генерации биспецифических IgG1 (bsIgG1). Протокол включает в себя следующие действия: (i) отдельную экспрессию двух родительских IgG1, содержащих однонаправленные точечные мутации соответствия в домене CH3; (ii) смешивание родительских IgG1 в допустимых окислительно-восстановительных условиях *in vitro*, чтобы позволить рекомбинацию половины молекул; (iii) удаление восстановителя, чтобы позволить повторное окисление межцепочечных дисульфидных связей; и (iv) анализ эффективности обмена и конечного продукта с помощью способов на основе хроматографии или способов на основе масс-спектрометрии (МС). Протокол генерирует BsAb с правильной архитектурой IgG, характеристиками и атрибутами качества как в лабораторном масштабе (от микрограмм до миллиграмм), так и в масштабе мини-биореактора (от миллиграмм до грамм), которые предназначены для моделирования крупномасштабного производства (килограммы). Начиная от очищенных белков хорошего качества, эффективность обмена $\geq 95\%$ может быть достигнута в течение 2-3 дней (включая контроль качества). См. Labrijn et al., *Natur Protocols* 9, 2450-2463 (2014); и Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 799-801 (2014).

Также рассматриваются антитела, имеющие более двух валентностей. Например, триспецифические антитела могут быть получены. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Типовые биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами на данной молекуле (например, белок TREM2 и/или белок DAP12 по настоящему описанию). В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифические антитела связываются с первым антигеном, таким как белок TREM2 или белок DAP12 по настоящему описанию, и вторым антигеном, способствуя транспорту через гематоэнцефалический барьер. Многочисленные антигены, известные в данной области техники, которые облегчают транспорт через гематоэнцефалический барьер (см., например, Gabathuler R., Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 48-57). Такие вторые антигены включают, не ограничиваясь ими, рецептор трансферрина (TR), инсулиновый рецептор (HIR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белки 1 и 2 рецептора липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептор дифтерийного токсина, включая CRM197 (нетоксичный мутант дифтерийного токсина), однодоменные антитела ламы, такие как TMEM 30(A) (флиппаза), белковые домены трансдукции, такие как TAT, Syn-B или пенетратин, полиаргинин или обычным образом положительно заряженные пептиды, пептиды ангиопеп, такие как ANG1005 (см., например, Gabathuler, 2010) и другие белки клеточной поверхности, которые насыщаются на эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера (см., например, Daneman et al., *PLoS One.* 2010 Oct 29; 5 (10): e13741). В некоторых вариантах реализации изобретения второй антиген для антитела к TREM2 может включать, без ограничений, антиген DAP12 по настоящему описанию. В других вариантах реализации изобретения второй антиген для антитела к DAP12 может включать, без ограничений, антиген TREM2 по настоящему описанию. В других вариантах реализации изобретения биспецифические антитела, которые связываются как с TREM2, так и DAP12, могут облегчить и усилить одну или более активностей TREM2 и/или DAP12. В других вариантах реализации изобретения вторые антигены для антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 могут включать, без ограничений, антиген к пептиду А бета или антиген к белку альфа-синуклеину, или антиген к тау-белку, или антиген к белку TDP-43, или антиген к прионному белку, или антиген к белку хантингтина или RAN, антиген к продуктам трансляции, включая дипептидные повторы (пептиды DPR), состоящие из глицин-аланина (GA), глицин-пролина (GP), глицин-аргинина (GR), пролин-аланина (PA) или пролин-аргинина (PR).

(7) Мультивалентные антитела.

Мультивалентное антитело может интернализироваться (и/или катаболизироваться) быстрее, чем би-

валентное антитело, клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела. Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию или фрагменты антител могут представлять собой мультивалентные антитела (которые могут относиться к классу, отличному от класса IgM) с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Мультивалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов. Предпочтительный домен димеризации содержит Fc-область или шарнирную область. В этом случае, антитело будет содержать Fc-область и три или более антигенсвязывающих сайтов со стороны N-конца Fc-области. Предпочтительное мультивалентное антитело, представленное в данном документе, содержит от трех до около восьми, но предпочтительно четыре, антигенсвязывающих сайта.

Мультивалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), причем полипептидная цепь содержит два или более переменных доменов. Например, полипептидная цепь или полипептидные цепи могут содержать VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, причем VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или полипептид, и n равно 0 или 1. Аналогично полипептидная цепь или полипептидные цепи могут содержать V_H-C_H1-подвижный линкер-V_H-C_H1-Fc-область цепи; или V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc-область цепи.

Мультивалентное антитело, представленное в данном документе, предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере два (и предпочтительно четыре) полипептида переменного домена легкой цепи. Мультивалентное антитело, представленное в данном документе, например, может содержать от приблизительно двух до около восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Полипептиды переменного домена легкой цепи, рассматриваемые в данном документе, содержат переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат домен CL. Мультивалентные могут распознавать антиген TREM2, а также, без ограничений, дополнительные антигены антиген к пептиду А бета или антиген к белку альфа-синуклеину, или антиген к тау-белку, или антиген к белку TDP-43, или антиген к прионному белку, или антиген к белку хантингтина или RAN, антиген к продуктам трансляции, включая дипептидные повторы (пептиды DPR), состоящие из глицин-аланина (GA), глицин-пролина (GP), глицин-аргинина (GR), пролин-аланина (PA) или пролин-аргинина (PR), инсулиновому рецептору, рецептору инсулиноподобному фактору роста. Рецептор трансферрина или любого другого антигена, которые облегчают перенос антител через гематоэнцефалический барьер.

(8) Инженерия эффекторной функции.

Кроме того, может быть желательной модификация антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию для изменения эффекторной функции и/или для увеличения периода полувыведения антитела в сыворотке. Например, сайт связывания с Fc-рецептором на константной области может быть модифицирован или мутирован с целью устранения или снижения аффинности связывания с определенными рецепторами Fc, такими как FcγRI, FcγRII, и/или FcγRIII (например, для снижения антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекторная функция нарушается путем устранения N-гликозилирования Fc-области (например, в домене CH2 IgG) антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекторная функция нарушается путем модификации областей, таких как 233-236, 297 и/или 327-331 IgG человека, как описано в PCT WO 99/58572 и Armour et al., *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). В некоторых вариантах реализации изобретения также может быть желательной модификация антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию с целью модификации эффекторной функции для повышения избирательности по отношению к FcγRIIb (CD32b), содержащих ИТМ, для повышения кластеризации антител на соседних клетках без активации гуморальных реакций, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность и антителозависимый клеточный фагоцитоз.

Для увеличения периода полувыведения можно встраивать эпитоп связывания рецептора реутилизации в антитело (особенно во фрагмент антитела), как описано, например, в патенте США 5739277. В данном контексте термин "эпитоп связывания рецептора реутилизации" относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), который отвечает за увеличение времени полувыведения молекулы IgG в сыворотке *in vivo*.

(9) Другие модификации аминокислотной последовательности.

Также рассматриваются модификации аминокислотной последовательности антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию или фрагментов антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антител или фрагментов антител. Варианты аминокислотной последовательности антител или фрагментов антител получают путем введения 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 осуществляется для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками (т.е., способностью связываться или физически взаимодействовать с белком TREM2 и/или белком DAP12 по настоящему описанию). Аминокислотные замены могут изменять посттрансляционные процессы антитела, например, изменять число или положение сайтов гликозилирования.

Пригодный способ идентификации некоторых остатков или областей антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12, которые являются предпочтительными положениями для мутагенеза, называется "мутагенезом с аланиновым сканированием", как описано Cunningham и Wells в Science, 244:1081-1085 (1989). Согласно данному методу идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещают их нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) с достижением взаимодействия аминокислот с антигеном. Такие положения аминокислот, обнаруживающие функциональную чувствительность к заменам, далее модифицируют введением дополнительных или других вариантов в сайты замен. Таким образом, в то время как сайт введения вариантов аминокислотной последовательности predetermined, природа мутации per se не обязательно может быть predetermined. Например, для анализа осуществления мутации в данном сайте аланин-сканирующий или выборочный мутагенез проводят в кодоне-мишени и области-мишени и экспрессируемые варианты антитела подвергают скринингу на заданную активность.

Вставки аминокислотных последовательностей включают аминокислоты ("N") и карбокси-("C") концевые слитые участки, варьирующие по длине от одного остатка до полипептида, содержащего сто или более аминокислотных остатков, а также участки из одной или множества аминокислотных остатков, находящихся внутри последовательностей. Примерами концевых вставок являются антагонисты с N-концевым остатком метионина или антагонисты, слитые с цитотоксическим полипептидом. Другие вставочные варианты молекулы антитела включают слияние к N- или C-концу антитела фермента или полипептида, что увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

Другой тип варианта представляет собой вариант, основанный на замене аминокислотных остатков. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен на другой остаток. Сайты, представляющие наибольший интерес для осуществления замещающего мутагенеза, включают гипервариабельные области, но перестройки FR также рассматриваются. Консервативные замены приведены в табл. А под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены изменяют биологическую активность, то они являются наиболее существенными изменениями и приведены в табл. А под заголовком " типовые замены", или как дополнительно описано ниже по отношению к классам аминокислот, могут быть введены и продукты подвергнуты скринингу.

Таблица А. Аминокислотные замены

| Исходный остаток | Типовые замены | Предпочтительные замены |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| 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 |
| 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 |

Существенные модификации биологических свойств антител сопровождаются избирательными заменами, которые значительно различаются по способности поддерживать (а) структуру полипептидного остова в области замены, например складчатую или спиральную конформацию, (b) заряд или гидрофобность молекулы в сайте-мишени и (c) размеры боковой цепи. Остатки естественного происхождения подразделяются на группы в зависимости от общих свойств боковых цепей:

- (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.

Неконсервативные замены включают замены аминокислотных остатков одного класса на аминокислотные остатки другого класса.

Цистеиновые остатки, которые не вовлечены в поддержание должной конформации антитела, также могут быть замещены в основном серином, для усиления устойчивости молекулы к окислению и предотвращения нежелательного перекрестного сшивания. В противоположность этому, цистеиновые связи могут быть введены в молекулу антитела для улучшения ее стабильности (особенно в тех случаях, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

Особенно предпочтительный тип варианта, полученного путем замены, включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека к TREM2 и/или гуманизированного антитела или антитела человека к DAP12). Как правило, полученный вариант(ы), отобранные для дальнейшей модификации, будут иметь улучшенные биологические свойства по отношению к исходному антителу, из которого они получены. Подходящий способ получения таких вариантов, полученных путем замены, включает аффинное созревание при использовании фагового дисплея. Коротко говоря, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутагенезу с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антитела далее выявляют в моновалентной форме на поверхности частиц нитчатого бактериофага в форме их слияния с продуктом гена III бактериофага M13, упакованного в каждую частицу. Фаговодисплейные варианты затем скринируют на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в данном документе. Для того чтобы идентифицировать возможные сайты модификации гипервариабельных областей, можно осуществить аланин-сканирующий мутагенез, позволяющий идентифицировать остатки гипервариабельных областей, которые в значительной степени обеспечивают связывание антигена. В альтернативном

варианте или дополнительно может оказаться полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для того, чтобы идентифицировать точки контакта между антигеном и антителом (например, белок TREM2 по настоящему описанию). Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются потенциальными мишенями для замены, согласно методам, представленным в данном документе. После создания таких вариантов их подвергают скринингу, как описано в данном документе, и антитела с улучшенными свойствами, как это устанавливается в одном или более соответствующих исследованиях, отбирают для дальнейшей модификации.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет первоначальный профиль гликозилирования антитела. Под изменением подразумевается удаление одной или более углеводной молекулы антитела и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые отсутствуют у антитела.

Гликозилирование полипептидов обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие трипептидных последовательностей в составе полипептида создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование заключается в прикреплении одного из Сахаров, к которым относятся N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза, к гидроксикамину, большей частью серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин также могут быть использованы.

Добавление участков гликозилирования к антителу удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Изменение также может быть сделано добавлением, заменой одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (сайты O-связанного гликозилирования).

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела к IgE, получают с помощью разнообразных способов, известных в данной области техники. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, выделение из природных источников (в случае вариантов аминокислотных последовательностей естественного происхождения) или получение с помощью опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-специфического) мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР, и с помощью кассетного мутагенеза ранее полученных вариантных или невариантных версий антител (например, антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию) или фрагментов антител.

(10) Другие модификации антитела.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию или фрагменты соответствующих антител могут быть дополнительно модифицированы, чтобы содержать дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области техники и легкодоступны, или содержать различные типы лекарственных конъюгатов, которые известны в данной области техники и легко доступны. Предпочтительно пригодные для получения производных антитела представляют собой водорастворимые полимеры.

Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливинилловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры проприленгликоля, сополимеры оксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливинилловый спирт и их смеси. Пропионовый альдегид полиэтиленгликоля может обладать преимуществами при производстве из-за его стабильности в воде. Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и быть разветвленным или неразветвленным. Число 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 получения производных, можно определить с учетом факторов, включающих, но не ограничиваясь ими, конкретные свойства или функции антитела, подлежащие улучшению, независимо от того, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях, и др. Такие методы и другие подходящие композиции раскрыты в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

Конъюгация лекарственного средства включает соединение биологически активной цитотоксической (противоопухолевой) 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 опухолевых клетках). 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 абсорбирует или поглощает антитело вместе с цитотоксином. После того как ADC поглощается, цитотоксическое лекарственное средство высвобождается и убивает рак. Благодаря такому таргетингу в идеале препарат имеет

более низкие побочные эффекты и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие химиотерапевтические агенты. Методы конъюгации антител раскрыты, известны в данной области техники (см., например, Jane de Lartigue, *OncoLive* July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; и Ducry et al., (2010). *Bioconjugate Chemistry* 21 (1): 5-13).

Анализы связывания и другие анализы.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию (например, активность антител к TREM2) могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу, или охарактеризованы относительно их физических/химических активностей и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники или анализов, описанных в примерах, приведенных в данном документе, таких как, например, иммунологические анализы с использованием радиоактивной метки, оптические анализы, анализы связывания с белками, биохимические скрининговые анализы, иммунологические анализы, флуоресцентные анализы и/или анализы выживаемости клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут быть исследованы на антигенсвязывающую активность, например, с помощью таких известных способов, как твердофазный ИФА, Вестерн-блоттинг и т.д.

В некоторых вариантах реализации изобретения конкурентные анализы могут быть использованы для идентификации антитела, которое конкурирует с любым из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, выбранных из Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87, и/или мАт17291 человека, и/или гуманизированного мАт17291 за связывание с TREM2. В некоторых вариантах реализации изобретения такое конкурирующее антитело связывается с одним и тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связан любым из антител, перечисленных в табл. 1 и/или табл. 8, выбранных из Ат1, Ат2, Ат3, Ат4, Ат5, Ат6, Ат7, Ат8, Ат9, Ат10, Ат11, Ат12, Ат13, Ат14, Ат15, Ат16, Ат17, Ат18, Ат19, Ат20, Ат21, Ат22, Ат23, Ат24, Ат25, Ат26, Ат27, Ат28, Ат29, Ат30, Ат31, Ат32, Ат33, Ат34, Ат35, Ат36, Ат37, Ат38, Ат39, Ат40, Ат41, Ат42, Ат43, Ат44, Ат45, Ат46, Ат47, Ат48, Ат49, Ат50, Ат51, Ат52, Ат53, Ат54, Ат55, Ат56, Ат57, Ат58, Ат59, Ат60, Ат61, Ат62, Ат63, Ат64, Ат65, Ат66, Ат67, Ат68, Ат69, Ат70, Ат71, Ат72, Ат73, Ат74, Ат75, Ат76, Ат77, Ат78, Ат79, Ат80, Ат81, Ат82, Ат83, Ат84, Ат85, Ат86 и Ат87, и/или мАт17291 человека, и/или гуманизированного мАт17291. Подробные типовые 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).

В типовом конкурентном анализе иммобилизованный TREM2 или клетки, экспрессирующие TREM2 на поверхности клетки, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, связывающееся с TREM2 (например, человека или не являющегося человеком примат), и второе немеченое антитело, исследуемое на предмет способности конкурировать с первым антителом за связывание с TREM2. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный TREM2 или клетки, экспрессирующие TREM2, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубирования в условиях, допускающих связывание первого антитела с TREM2, удаляют избыток несвязанного антитела и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным TREM2 или клетками, экспрессирующими TREM2. Если количество метки, связанной с иммобилизованным TREM2 или клетками, экспрессирующими TREM2, существенно снижается в анализируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с TREM2. See Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В некоторых вариантах реализации изобретения предусмотрены анализы для идентификации агонистических антител к TREM2 и/или агонистических антител к DAP12 по настоящему описанию, имеющих биологическую активность. Биологическая активность может включать, например, индуцирование, содействие, стимулирование или иное повышение еще одной активности TREM2 и/или DAP12. Также предложены агонистические антитела к TREM2 и/или агонистические антитела к DAP12, обладающие такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

Анализы, известные в данной области техники, и описанные в данном документе (см, например, Примеры 23-27, 33-38, 41-44, 52-55 и 67-68) могут быть использованы для идентификации и исследования биологической активности антител к TREM2 и/или антител к DAP12, которые индуцируют, содействуют, стимулируют или, иным образом, повышают еще одну активность TREM2 и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены анализы для исследования одной или более активностей агонистических антител к TREM2 и/или агонистического антитела к DAP12. Типовое исследование на биологическую активность может включать, например, обработку популяции иммунных клеток, таких как врожденные иммунные клетки, экспрессирующие TREM2 и/или DAP12, агонистическим

антителом кандидатом к TRME2 и/или агонистическим антителом кандидатом к DAP12 в течение достаточного времени, чтобы обеспечить связывание и активацию белка TREM2 и/или белка DAP12, и измерение выживаемости клеток (или гибели клеток) по сравнению с выживаемостью клеток (или гибелью клеток) в соответствующей популяции в отсутствие антитела кандидата. Способы измерения клеточной выживаемости или гибели клеток хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. Агонистические антитела к TRME2 и/или агонистические антитела к DAP12 могут быть идентифицированы по их способности способствовать или продлевать выживаемость клеток или задерживать гибель клеток в популяции клеток относительно контрольной популяции клеток, например, популяции клеток, которую не обрабатывали агонистическим антителом кандидатом. Некоторые аспекты настоящего описания относятся к способам идентификации агонистического антитела кандидата, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12. В некоторых вариантах реализации изобретения способ идентификации агонистического антитела кандидата, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12, включает: а. контактирование популяции врожденных иммунных клеток, экспрессирующих TREM2 и/или DAP12 на своей поверхности, с агонистическим антителом кандидатом, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12 в течение периода времени, достаточного для того, чтобы агонистическое антитело кандидат способствовало выживаемости клеток в популяции врожденных иммунных клеток; б. сравнение выживаемости популяции контактных врожденных иммунных клеток с выживаемостью клеток из соответствующей популяции врожденных иммунных клеток, не контактировавшей с агонистическим антителом кандидатом, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12, причем повышенная выживаемость клеток из популяции контактных врожденных иммунных клеток указывает на то, что антитело кандидат является агонистом. Другие аспекты настоящего описания относятся к выделенному антителу, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12, идентифицированными любым из раскрытых способов идентификации антитела, которое специфически связывается с TREM2 и/или DAP12.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию можно получить с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, кодирующую любые антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В некоторых вариантах реализации изобретения предложены один или более векторов (например, экспрессирующих векторов), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой выделенную клетку-хозяина. В данном контексте "выделенная клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей клетки, с которой она обычно связана в окружающей среде, в которой она была произведена. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенная клетка не связана со всеми компонентами, с которыми она связана в среде продуцирования. Выделенная клетка представлена в иной форме, чем форма или условия, в которых они находятся в природе. Выделенные клетки отличаются от клеток, существующих естественным образом в тканях, органах или индивидуумах. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенная клетка представляет собой клетку-хозяина по настоящему описанию. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин содержит (например, была трансдуцирована с): (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. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, Y0, NS0, клетка Sp20). Клетки-хозяева по настоящему описанию также включают, не ограничиваясь ими, выделенные клетки, культивированные *in vitro* клетки и культивированные *ex vivo* клетки.

Предложены способы получения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему описанию, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12, в условиях, пригодных для экспрессии антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело затем извлекают из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантной продукции антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12, является выделенной и вставленной в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такую нуклеиновую кислоту легко выделить и секвенировать с использованием общепринятых

процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любые антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию или фрагменты их полипептидов (включая антитела), описанные в данном документе, включают, не ограничиваясь ими, клонирующие векторы и экспрессирующие векторы. Подходящие клонирующие векторы могут быть сконструированы в соответствии со стандартными методами или могут быть выбраны из большого числа клонирующих векторов, доступных в данной области техники. Хотя выбранный клонирующий вектор может варьировать в зависимости от клетки-хозяина, предназначенной для использования, подходящие клонирующие векторы, 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 выборе клонов, содержащих вектор. Пригодные примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны у коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene и Invitrogen.

Экспрессирующие векторы, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по настоящему описанию. Экспрессирующие векторы могут реплицироваться в клетках-хозяевах в виде эписомы или в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и экспрессирующий вектор(ы), раскрытые в публикации РСТ № WO 87/04462. Векторные компоненты как правило могут включать, но не ограничиваются ими, один или более из следующих: сигнальную последовательность; начало репликации; один или более маркерных генов; подходящие элементы контроля транскрипции (такие как промоторы, энхансеры и терминатор). Для экспрессии (т.е. трансляции), обычно также необходимы один или более регуляторных элементов трансляции, такие как сайты связывания рибосом, сайты инициации трансляции и стоп-кодоны.

Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию; и инфекцию (например, когда вектор является инфекционным агентом, таким как вирус осповакцины). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов часто зависит от особенностей клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую один или более аминокислотных последовательностей, кодирующих антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию.

Пригодные клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 можно продуцировать в бактериях, в частности, если гликозилирование и эффекторные функции Fc не являются необходимыми. В отношении экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях (например, патенты США № 5648237, 5789199, и 5840523; и Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антитела в *E.coli*). После экспрессии антитело можно перевести из массы бактериальных клеток в растворимую фракцию, после чего дополнительно очистить.

В дополнение к прокариотам, пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, также являются эукариотические микроорганизмы, например мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей с "гуманизированными" путями гликозилирования, что приводит к продукции антитела с профилем гликозилирования, частично или полностью характерным для человека (например, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

Пригодные для экспрессии гликозилированного антитела клетки-хозяева могут также происходить от многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Кроме того, в качестве хозяев можно использовать культуры клеток растений (например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, и 6417429, где описана технология PLANTIBOD-IES™ относительно продукции антител в трансгенных растениях).

Кроме того, в качестве хозяев можно использовать клетки позвоночных. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные к росту в суспензии. К другим примерам подходящих клеточных линий млекопитающих в качестве клеток-хозяев относятся линия клеток CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия человеческих эмбриональных клеток почек (293 или клетки 293, которые описаны, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки детеныша хомячка (BHK); мышинные клетки Сертоли (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol.*

Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки мартышки (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 (Her G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие подходящие, полученные из млекопитающих, линии клеток-хозяев включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и миеломные клеточные линии, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор по некоторым полученным из млекопитающих линиям клеток-хозяев, пригодных для получения антител, можно найти, 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.

Антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут быть включены в различные лекарственные формы для терапевтического введения посредством комбинирования антител с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и может быть приготовлено в виде препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах. Примеры таких лекарственных форм включают, не ограничиваясь ими, таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, препараты для инъекций, средства для ингаляции, гели, микросферы и аэрозоли. В зависимости от лекарственной формы фармацевтические композиции могут включать фармацевтически приемлемые, нетоксические носители или разбавители, которые являются традиционно применяемыми носителями для изготовления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы не влиять на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются, не ограничиваясь ими, дистиллированная вода, забуференная вода, физиологический раствор, ФСБ, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Фармацевтическая композиция или лекарственная форма по настоящему описанию может дополнительно включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы, вспомогательные вещества и тому подобное. Композиции также могут включать дополнительные вещества для достижения условий, приближенных к физиологическим, такие как буферные агенты, агенты, регулирующие pH и токсичность, увлажняющие агенты и детергенты.

Фармацевтическая композиция по настоящему описанию может также включать любой из множества стабилизирующих агентов, таких как, например, антиоксидант. Когда фармацевтическая композиция включает полипептид, этот полипептид может образовывать комплекс с различными хорошо известными соединениями, которые усиливают устойчивость полипептида *in vivo* или, иным образом, повышают его фармакологические свойства (например, увеличивают период полувыведения полипептида, уменьшают его токсичность и повышают растворимость или поглощение). Примеры таких модификаций или комплексообразователей включают, не ограничиваясь ими, сульфат, глюконат, цитрат и фосфат. Полипептиды композиции также могут быть объединены с молекулами, которые усиливают их качества *in vivo*. Такие молекулы включают, не ограничиваясь ими, углеводы, полиамины, аминокислоты, другие пептиды, ионы (например, натрий, калий, кальций, магний, марганец) и липиды.

Другие примеры лекарственных форм, которые подходят для различных типов введения, можно найти в Remington Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). Краткий обзор методов доставки лекарств см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990).

Для перорального введения активный ингредиент можно вводить в твердых лекарственных формах, таких как капсулы, таблетки и порошки, или в жидких дозированных формах, таких как эликсиры, сиропы и суспензии. Активный(ые) компонент(ы) можно инкапсулировать в желатиновые капсулы вместе с неактивными ингредиентами и порошкообразными носителями, такими как глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, крахмал, целлюлоза или производные целлюлозы, стеарат магния, стеариновая кислота, сахарин натрия, тальк, карбонат магния. Примерами дополнительных неактивных ингредиентов, которые могут быть добавлены для обеспечения желаемого цвета, вкуса, стабильности, буферной способности, дисперсии или других известных желательных свойств, являются красный оксид железа, силикагель, лаурилсульфат натрия, диоксид титана и съедобные белые чернила. Подобные разбавители можно использовать для изготовления прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы могут быть изготовлены в виде продуктов с замедленным высвобождением для обеспечения непрерывного высвобождения лекарственного средства в течение нескольких часов. Прессованные таблетки могут быть покрыты сахаром или покрыты оболочкой, чтобы замаскировать любой неприятный вкус и защитить таблетку от атмосферного влияния, или покрыты энтеросолюбильной оболочкой для селективного разложения в желудочно-кишечном тракте. Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут содержать красители и ароматизаторы, повышающие восприимчивость пациента.

Препараты, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворимые вещества, которые поддерживают изотоничность препарата с кровью предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

Компоненты, используемые для получения фармацевтических композиций, предпочтительно имеют высокую чистоту и практически свободны от потенциально опасных примесей (например, по меньшей мере степень чистоты для пищевых продуктов (NF), как правило, по меньшей мере аналитическую степень чистоты, а в основном по меньшей мере фармацевтическую степень чистоты). Кроме того, композиции, предназначенные для использования *in vivo*, обычно являются стерильными. В той мере, в которой данное соединение должно быть синтезировано перед использованием, конечный продукт, как правило, по существу не содержит никаких потенциально токсических агентов, особенно любых эндотоксинов, которые могут присутствовать в процессе синтеза или очистки. Композиции для парентерального введения также являются стерильными, по существу изотоническими и изготовлены в условиях GMP.

Препараты могут быть оптимизированы для сохранения и стабилизации в головном мозге или центральной нервной системе. В случае если агент вводится в краниальный отдел, желательно, чтобы агент удерживался в отделе, а не диффундировал или, иным образом, не пересекал гематоэнцефалический барьер. Методы стабилизации включают перекрестное сшивание, мультимеризацию или связывание с группами, такими как полиэтиленгликоль, полиакриламид, нейтральные белковые носители, и т.д. для достижения увеличения молекулярной массы.

Другие стратегии для увеличения удержания включают помещение антитела, такого как антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию в биоразлагаемом или биоразрушаемом имплантате. Скорость высвобождения терапевтически активного агента регулируется скоростью транспорта через полимерную матрицу и биодegradацией имплантата. Транспортировка лекарственного средства через полимерный барьер также будет зависеть от растворимости соединения, гидрофильности полимера, степени перекрестного сшивания полимера, расширения полимера при поглощении воды, настолько чтобы сделать полимерный барьер более проницаемым для лекарственного средства, геометрии имплантата, и тому подобное. Имплантаты имеют размеры, соизмеримые с размером и формой области, выбранной в качестве места имплантации. Имплантаты могут представлять собой частицы, листы, пластыри, бляшки, волокна, микрокапсулы и тому подобное и могут быть любого размера или формы, совместимой с выбранным местом введения.

Имплантаты могут быть монолитными, т.е. имеющими активный агент, однородно распределенный по полимерной матрице, или инкапсулированными, причем резервуар активного агента инкапсулирован полимерной матрицей. Выбор используемой полимерной композиции будет варьироваться в зависимости от места введения, желаемого периода лечения, переносимости пациента, характера заболевания, подлежащего лечению, и тому подобного. Характеристики полимеров будут включать биодegradируемость в месте имплантации, совместимость с представляющим интерес агентом, легкость инкапсулирования, период полувыведения в физиологической среде.

Биодegradируемые полимерные композиции, которые можно использовать, включают, не ограничиваясь ими, органические сложные эфиры или простые эфиры, разложение которых приводит к физиологически приемлемым продуктам, включая мономеры. Могут найти применение ангидриды, амиды, ортоэфиры и тому подобное непосредственно или в комбинации с другими мономерами. Полимеры представляют собой конденсационные полимеры. Полимеры могут быть или не быть перекрестно-связанными. Особый интерес представляют полимеры гидроксиалкифатических карбоновых кислот, как гомо-, так и кополимеры, и полисахариды. Представляющие интерес сложные полиэфиры включают полимеры D-молочной кислоты, L-молочной кислоты, рацемической молочной кислоты, гликолевой кислоты, поликапролактона и их комбинаций. Использование L-лактата или D-лактата обеспечивает медленно биодegradирующий полимер, вместе с тем рацемат существенно усиливает деградацию. Сополимеры гликолевой и молочной кислот представляют особый интерес, когда скорость биодegradации контролируется отношением гликолевой кислоты к молочной кислоте. Наиболее быстро деградующий сополимер имеет примерно равные количества гликолевой и молочной кислот, причем каждый гомополимер более устойчив к деградации. Отношение гликолевой кислоты к молочной кислоте также влияет на хрупкость имплантата, причем более гибкий имплантат является подходящим для больших геометрических размеров. Среди представляющих интерес полисахаридов альгинат кальция и функционализированные целлюлозы, в частности сложные эфиры карбоксиметилцеллюлозы, характеризуются тем, что они нерастворимы в воде, имеют молекулярную массу от около 5 до 500 кДа, и т.д. Биодegradируемые гидрогели также могут быть использованы в имплантатах по настоящему изобретению. Как правило, гидрогели представляют собой сополимерный материал, характеризующийся способностью впитывать жидкость. Типовые биодegradируемые гидрогели, которые могут быть использованы, описаны в Heller: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, N.A. Peppas ed., Vol. III, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, pp 137-149.

Дозировки лекарственных препаратов.

Фармацевтические композиции по настоящему описанию, содержащие антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию, могут быть введены индивидууму, нуждающемуся в лечении антителом к TREM2 и/или антителом к DAP12, предпочтительно человеку, в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечной, внутривнутрибрюшинной, внутривнутричерепной,

внутричерепной, интраспинальной, подкожной, внутрисуставной, интратекальной, пероральной, или посредством местных или ингаляционных путей введения.

Дозировки и желаемая концентрация лекарственных средств в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться в зависимости от конкретного предполагаемого использования. Определение подходящей дозы или способа введения находится в пределах компетенции среднего специалиста в данной области техники. Эксперименты на животных обеспечивают надежное руководство для определения эффективных доз для терапии человека. Межвидовое масштабирование эффективных доз может быть выполнено в соответствии с принципами, описанными в Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," в *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46.

Для введения *in vivo* любого из антител к TREM2 и/или антител к DAP12 по настоящему описанию нормальные дозировочные количества могут варьироваться от около 10 нг/кг до около 100 мг/кг от веса тела индивидуума в день или более, предпочтительно от около 1 до 10 мг/кг/день, в зависимости от пути введения. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от тяжести заболевания, нарушения или патологического состояния, подлежащего лечению, лечение поддерживается до достижения желаемого подавления симптомов.

Типовая схема применения может включать введение начальной дозы антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12, от около 2 мг/кг, с последующей недельной поддерживающей дозой от около 1 мг/кг каждую вторую неделю. Могут быть полезными и другие схемы применения, в зависимости от того, какой характер фармакокинетического распада является желаемым для врача. Например, в данном документе рассматривается дозирование индивидуума от одного до двадцати одного раза в неделю. В некоторых вариантах реализации изобретения может использоваться дозирование в диапазоне от около 3 мкг/кг до около 2 мг/кг (например, около 3 мкг/кг, около 10 мкг/кг, около 30 мкг/кг, около 100 мкг/кг, около 300 мкг/кг, около 1 мг/кг и около 2 мг/кг). В некоторых вариантах реализации изобретения частота приема лекарственного средства составляет три раза в день, два раза в день, один раз в день, один раз в два дня, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые четыре недели, один раз каждые пять недель, один раз каждые шесть недель, один раз каждые семь недель, один раз каждые восемь недель, один раз каждые девять недель, один раз каждые десять недель или один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца или дольше. Ход лечения легко наблюдать с помощью обычных методов и анализов. Схема применения, включая вводимое антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12, может изменяться в динамике независимо от используемой дозы.

Дозы для конкретного антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым было назначено одно или более введений антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12. Индивидуумы получают нарастающие дозы антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12. Чтобы оценить эффективность антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12, можно контролировать клинический симптом любого из заболеваний, расстройств или патологических состояний по настоящему описанию (например, деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакота и рассеянного склероза).

Введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может быть непрерывным или периодическим в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, является ли назначение введения терапевтическим или профилактическим и других факторов, известных квалифицированным практикам. Введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может быть по существу непрерывным в течение заранее выбранного периода времени или может происходить в серии интервальных доз.

Рекомендации в отношении конкретных доз и способов доставки приведены в литературе; см., например, патенты США № 4657760; 5206344; и 5225212. В пределах объема изобретения различные лекарственные формы будут эффективны для различных видов лечения и различных расстройств, и что введение, предназначенное для лечения конкретного органа или ткани, может требовать доставки способом, отличным от способа доставки в другой орган или ткань. Кроме того, дозировки могут быть введены посредством одного или более отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до желаемого подавления симптомов заболевания. В то же время можно применять другие схемы приема. Ход лечения можно контролировать с помощью обычных методов и анализов.

Терапевтическое применение.

Дополнительные аспекты настоящего описания предусматривают способы модулирования (например, активации или ингибирования) TREM2, модулирования (например, активации или ингибирования) DAP12, модулирования (например, активации или ингибирования) ФИЗК, модулирования (например, увеличения или снижения) экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов (например, ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10) или модулирования (например, увеличения или снижения) экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов (например, ИЛ-1 β и ФНО) у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию для модулирования (например, индуцирования или ингиби-

рования) одной или более активностей TREM2 и/или активностей DAP12 у индивидуума.

Как описано в данном документе, антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут быть использованы для предупреждения, снижения риска или лечения деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдрома Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелимита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и рака (например, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак ободочной кишки и прямой кишки, рак эндометрия, рак почки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, лейкемия, рак легких, меланома, неходжкинская лимфома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, фибросаркома, и рак щитовидной железы). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 представляют собой агонистические антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 представляют собой инертные антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 представляют собой антагонистические антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее описание предусматривает способы предупреждения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего деменцию, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, мультиинфарктную деменцию, смешанную деменцию, болезнь Крейтцфельда-Якоба, нормотензивную гидроцефалию, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, таупатию, болезнь Насу-Хакола, инсульт, острую травму, хроническую травму, волчанку, острый и хронический колит, заживления ран, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, неспецифический язвенный колит, ожирение, малярию, эссенциальный тремор, волчанку центральной нервной системы, болезнь Бехчета, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию, синдром Шая-Дрейджера, болезнь Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальную базальную ганглионарную дегенерацию, острый рассеянный энцефаломиелимит, гранулематоз, саркоидоз, болезнь старения, эпилептиформные припадки, травму спинного мозга, черепно-мозговую травму, возрастную дегенерацию желтого пятна, глаукому, пигментный ретинит, дегенерацию сетчатки, инфекцию дыхательных путей, сепсис, глазную инфекцию, системную инфекцию, волчанку, артрит, рассеянный склероз, низкую плотность костной ткани, остеопороз, остеогенез, болезнь, связанную с остеопорозом, болезнь Педжета кости и рак, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию для модулирования (например, индуцирования или ингибирования) одной или более активностей TREM2, включая, не ограничиваясь ими, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов (например, ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10) или экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов (например, ИЛ-1 β и ФНО). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 представляет собой агонистическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 представляет собой инертное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 представляет собой антагонистическое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий замену глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток 14 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий замену глутамин на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток 33 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий замену триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток 44 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий аминокислотную замену аргинина на гистидин в аминокислотном остатке 47 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий замену триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток 78 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий аминокислотную замену валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку 126 белка TREM2 человека (SEQ ID

NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий аминокислотную замену аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку 134 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий аминокислотную замену лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку 186 белка TREM2 человека (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля TREM2, имеющий нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; аминокислотную замену треонина на метионин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Thr66 из SEQ ID NO: 1; и/или аминокислотную замену серина на цистеин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Ser116 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум имеет гетерозиготный вариант аллеля DAP12, имеющий аминокислотную замену метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2, аминокислотную замену глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2, делецию в пределах экзонов 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2, вставку из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2 и/или нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

Как описано в данном документе, антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию также могут быть использованы для индуцирования и/или для стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее описание предлагает способы индуцирования или стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию.

Как описано в данном документе, антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию также могут быть использованы для индуцирования и/или стимулирования заживления ран, например, после травмы. В некоторых вариантах реализации изобретения заживление раны может быть заживлением раны толстой кишки после травмы. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее описание предлагает способы индуцирования или стимулирования заживления ран у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества агонистического антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию.

Как описано в данном документе, антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию также могут быть использованы для ингибирования выживаемости врожденных иммунных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее описание предлагает способы ингибирования выживаемости врожденных иммунных клеток у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества антагонистического антитела к TREM2 и/или к DAP12 по настоящему описанию.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы по настоящему описанию могут включать совместное введение антител к TREM2 и/или антител к DAP12 или биспецифических антител, которые связываются как с TREM2, так и с DAP12, с антагонистическими TLR или с агентами, нейтрализующими агонистические TLR (например, нейтрализующими антитела к цитокину или антитела к интерлейкину).

В некоторых вариантах реализации изобретения способы по настоящему описанию могут включать введение химерных конструкций, включая антитело к TREM2 и/или антитело к DAP12 по настоящему описанию в сочетании с лигандом TREM2, таким как HSP60.

Деменция.

Деменция представляет собой неспецифический синдром (т.е. набор признаков и симптомов), который представляет собой серьезную потерю глобальных когнитивных способностей у человека, ранее не имеющего отклонений, помимо того, что можно ожидать от нормального старения. Деменция может быть статической вследствие уникальной глобальной травмы головного мозга. В альтернативном варианте, деменция может быть прогрессивной, что приводит к долгосрочному ухудшению здоровья из-за повреждения или заболевания в организме. В то время как деменция является гораздо более распространенной среди гериатрического населения, заболевание также может наблюдаться в возрасте до 65 лет. Когнитивные области, страдающие в результате деменции, включают, не ограничиваясь ими, память, концентрацию внимания, язык и решения проблем. Как правило, симптомы должны проявляться в течение по меньшей мере шести месяцев до того, как у индивидуума будет диагностирована деменция.

Типовые формы деменции включают, не ограничиваясь ими, лобно-височную деменцию, болезнь Альцгеймера, мультиинфарктную деменцию, семантическую деменцию и деменцию с телами Леви.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить деменцию. В некоторых вариан-

тах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего деменцию (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Лобно-височная деменция.

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой патологическое состояние, которое приводит к прогрессирующему разрушению лобной доли головного мозга. Со временем дегенерация может перейти в височную долю. Уступая только болезни Альцгеймера (БА) в распространенности, ЛВД составляет 20% случаев пресенильной деменции. Клинические признаки ЛВД включают нарушения памяти, поведенческие отклонения, изменения личности и языковые нарушения (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C., *Trends Genet.* 24:186-194 (2008); Neary, D., et al., *Neurology* 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. & Hodges, J.R., *Neurology* 58:1615-1621 (2002)).

Значительная часть случаев ЛВД унаследована за аутосомно-доминантным типом, но даже в одной семье симптомы могут охватывать спектр от ЛВД с поведенческими нарушениями до первичной прогрессирующей афазии, до ганглиозной дегенерации кортико-базального отдела. ЛВД, как и большинство нейродегенеративных заболеваний, может характеризоваться патологическим присутствием специфических белковых агрегатов в пораженном мозге. Исторически первые описания ЛВД определяли наличие внутринейрональных скоплений гиперфосфорилированного белка тау в нейрофибриллярных клубках или телах Пика. Причинная роль белка, связанного с микротрубочками, была подтверждена идентификацией мутаций в гене, кодирующем белок тау в нескольких семьях (Hutton, M., et al., *Nature* 393:702-705 (1998)). Однако большинство мозгов, пораженных ЛВД, не обнаруживают накопления гиперфосфорилированного тау, но проявляют иммунореактивность к убиквитину (Ub) и ДНК-связывающему белку TAR (GDP43) (Neumann, M., et al., *Arch. Neurol.* 64:1388-1394 (2007)). Показано, что большинство из этих случаев ЛВД с включениями Ub (ЛВД-U) несут мутации в гене програнулина.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить ЛВД. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего ЛВД (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой деменции. Не существует лекарства от этой болезни, которая ухудшается по мере ее прогрессирования и в конечном итоге приводит к смерти. Чаще всего БА диагностируется у людей старше 65 лет. Тем не менее, менее распространенная болезнь Альцгеймера с ранним началом может произойти гораздо раньше.

Общие симптомы болезни Альцгеймера включают поведенческие симптомы, такие как трудности с запоминанием недавних событий; когнитивные симптомы, путаницу, раздражительность и агрессию, перепады настроения, проблему с речью и долгосрочную потерю памяти. По мере прогрессирования заболевания функции организма теряются, что в конечном итоге приводит к смерти. Болезнь Альцгеймера развивается в течение неизвестного и изменчивого количества времени, прежде чем стать полностью очевидной, и она может прогрессировать недиагностированной годами.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего болезнь Альцгеймера (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Болезнь Насу-Хакола.

Болезнь Насу-Хакола (БНХ), которая в альтернативном варианте может называться поликистозной липомембранной остеодисплазией со склерозной лейкоэнцефалопатией (ПЛОСЛ), является редкой наследственной лейкодистрофией, характеризующейся прогрессирующим пресенильным слабоумием, связанным с рецидивирующими переломами костей из-за поликистозных костных повреждений нижних и верхних конечностей. Как течение заболевания БНХ делится на четыре стадии: латентная, костная, ранняя неврологическая и поздняя неврологическая. После нормального развития в детстве (латентная стадия), БНХ начинает проявляться в подростковом или юношеском возрасте (типичный возраст начала 20-30 лет) с болью в руках, запястьях, лодыжках и ступнях. Затем пациенты начинают страдать от повторяющихся переломов костей из-за поликистозных костных и остеопоротических поражений в костях конечностей (костная фаза). В течение третьего или четвертого десятилетия жизни (ранняя неврологическая стадия) у пациентов наблюдаются выраженные личностные изменения (например, эйфория, отсутствие концентрации внимания, потеря способности критического анализа и социальное торможение), характерные для синдрома лобной доли. Как правило, пациенты также страдают от прогрессирующего

нарушений памяти. Также часто наблюдаются эпилептические приступы. Наконец (поздняя неврологическая стадия), пациенты прогрессируют до глубокой деменции, не могут говорить и двигаться, и обычно умирают к 50 годам.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить болезнь Насу-Хакола. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего болезнь Насу-Хакола (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона, которую можно назвать идиопатическим или первичным паркинсонизмом, гипокинетическим ригидным синдромом (ГРС) или дрожательным параличом, является нейродегенеративным заболеванием мозга, которое влияет на регуляцию двигательной системы. Прогрессирующая гибель допамин-продуцирующих клеток головного мозга приводит к основным симптомам болезни Паркинсона. Чаще всего болезнь Паркинсона диагностируется у людей старше 50 лет. Болезнь Паркинсона является идиопатической (не имеющей известной причины) у большинства людей. Однако генетические факторы также играют определенную роль в заболевании.

Симптомы болезни Паркинсона включают, не ограничиваясь ими, тремор кистей, рук, ног, челюсти и лица, мышечную ригидность в конечностях и туловище, медлительность движения (брадикинезию), постуральную нестабильность, затруднение при ходьбе, психоневрологические проблемы, изменение речи или поведения, депрессию, беспокойство, боль, психоз, слабоумие, галлюцинации и проблемы со сном.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего болезнь Паркинсона (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Боковой амиотрофический склероз.

В данном контексте боковой амиотрофический склероз (БАС) или болезнь моторных нейронов, или болезнь Лу Герига используются взаимозаменяемо и относятся к изнурительной болезни с различной этиологией, характеризующейся быстро прогрессирующей слабостью, мышечной атрофией и фасцикуляциями, мышечной спастичностью, затруднением речи (дизартрией), затруднением глотания (дисфагией) и затруднением дыхания (одышкой).

Было показано, что програнулин играет роль при БАС (Schymick, J.C. et al., (2007) *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*; 78:754-6) и защищает от повреждения, вызванного белками, вызывающими БАС, такими как TDP-43 (Laird, A.S. et al., (2010). *PLoS ONE* 5: e13368). Также было продемонстрировано, что про-НФ индуцирует р75-опосредованную гибель олигодендроцитов и кортикоспинальных нейронов после повреждения спинного мозга (Beatty et al., *Neuron* (2002),36, pp. 375-386; Giehl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (2004), 101, pp 6226-30).

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить болезнь БАС. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего БАС (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Болезнь Хантингтона.

Болезнь Хантингтона (БХ) является наследственным нейродегенеративным заболеванием, вызванным аутосомно-доминантной мутацией в гене *Huntingtin* (НТТ). Распространение цитокин-аденингуанинового (ЦАГ) триплетного повтора в гене *Huntingtin* приводит к получению мутантной формы белка *Huntingtin* (Htt), кодируемого геном. Этот мутантный белок *Huntingtin* (mHtt) является токсичным и способствует гибели нейронов. Симптомы болезни Хантингтона чаще всего появляются между 35 и 44 годами, хотя они могут появляться в любом возрасте.

Симптомы болезни Хантингтона включают, не ограничиваясь ими, проблемы с регуляцией моторики, отрывистые, случайные движения (хорею), аномальные движения глаз, нарушение равновесия, судороги, затруднение жевания, затруднение глотания, когнитивные проблемы, измененную речь, недостаток памяти, трудности мышления, бессонницу, усталость, слабоумие, изменения в личности, депрессия, беспокойство и компульсивное поведение.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить болезнь Хантингтона (БХ). В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или

более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего болезнь Хантингтона (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Таупатия.

Болезнь таупатия или тупатии являются классом нейродегенеративных заболеваний, вызванных кластеризацией связанных с микротрубочками белков тау в головном мозге. Болезнь Альцгеймера (БА) является самой известной таупатией и включает накопление белка тау в нейронах в виде нерастворимых нейрофибриллярных клубков (ННК). Другие болезни и расстройства таупатии включают прогрессирующий супрануклеарный паралич, деменцию боксеров (хроматическую травматическую энцефалопатию), фронтотемпоральное слабоумие и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17, болезнь литикободиг (комплекс Паркинсона-деменции Гуама), деменцию с преобладанием клубков, ганглиоглиому и ганглиоцитому, менингиоангиоматозис, подострый склерозирующий панэнцефалит, свинцовую энцефалопатию, туберозный склероз, болезнь Галлервордена-Шпатца, липофусциноз, болезнь Пика, кортикобазальную дегенерацию, болезнь аргирофильных зерен (БАЗ), болезнь Хантингтона, лобно-височную деменцию и лобно-височную дегенерацию лобно-височной доли.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить таупатию. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего таупатию (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (РС) может также называться множественным склерозом или рассеянный склероз. РС представляет собой воспалительное заболевание, при котором жиродержащие миелиновые оболочки вокруг аксонов головного и спинного мозга являются поврежденными, что приводит к демиелинизации и рубцеванию, а также широкому спектру признаков и симптомов. РС влияет на способность нервных клеток в головном и спинном мозге эффективно взаимодействовать друг с другом. Нервные клетки общаются посредством отправления электрических сигналов, называемых потенциалами действия, вдоль длинных волокон, называемых аксонами, которые содержатся в изолирующем веществе, называемом миелином. При РС собственная иммунная система организма атакует и повреждает миелин. В случае если миелин теряется, аксоны перестают эффективно проводить сигналы. Начальная стадия РС обычно встречается у молодых людей и чаще встречается у женщин.

Симптомы РС включают, не ограничиваясь ими, изменения в восприятии, такие как потеря чувствительности или покалывание; покалывание или онемение, такие как гипостезия и парестезия; мышечную слабость; клонус; мышечные спазмы; проблемы с передвижением; проблемы с координацией и равновесием, такие как атаксия; проблемы с речью, такие как дизартрия или проблемы при глотании, такие как дисфагия; визуальные проблемы, такие как нистагм, неврит зрительного нерва, включая фосфены и диплопию; усталость; острую или хроническую боль; а также проблемы с мочевым пузырем и кишечником; когнитивные нарушения различной степени; эмоциональные симптомы депрессии или нестабильного настроения; феномен Ухтоффа, который является обострением существующих симптомов из-за воздействия более высоких, чем обычно окружающих температур; и симптом Лермитта, который является ощущением электрического разряда, проходящего вниз по спине при повороте шеи.

Без ограничения теорией полагают, что введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить рассеянный склероз. В некоторых вариантах реализации изобретения введение антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 может индуцировать одну или более активностей TREM2 и/или DAP12 у индивидуума, имеющего рассеянный склероз (например, фосфорилирование DAP12, активацию ФИЗК, повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов или пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов).

Рак.

Еще дополнительные аспекты настоящего описания предлагают способы для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего рак, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию. Любые из выделенных антител по настоящему описанию могут быть использованы в этих способах. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело представляет собой агонистическое антитело по настоящему описанию. В других вариантах реализации изобретения выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело по настоящему описанию.

Как описано выше, известно, что микроокружение опухоли содержит гетерогенный иммунный инфильтрат, который включает Т-лимфоциты, макрофаги и клетки миелоидного/гранулоцитарного происхождения. В частности, наличие макрофагов M2 в опухолях связано с плохим прогнозом. Препараты, которые уменьшают количество этих клеток в опухоли, такие как агенты, блокирующие CSF1R, показывают положительные эффекты в доклинических моделях и на ранних стадиях клинических исследова-

ний. Было показано, что TREM2 синергирует с CSF1 для способствования выживаемости макрофагов *in vitro*, и что этот эффект особенно заметен по отношению к макрофагам типа M2 по сравнению с другими типами фагоцитарных клеток. Предварительное доклиническое исследование также продемонстрировало синергию между препаратами, нацеленными на макрофаги, связанные с опухолью (например, антитела, блокирующие CSF1/CSF1R), и антителами, блокирующими контрольные точки, которые нацелены на Т-клетки, что указывает на то, что манипулирование обоими типами клеток демонстрирует эффективность в моделях опухолей, где индивидуальные методы лечения недостаточно эффективны (Zhu Y; Cancer Res. 2014 Sep 15; 74(18):5057-69). Поэтому, без ограничения теорией считается, что блокирование передачи сигналов TREM2 в макрофагах, связанных с опухолью, может ингибировать подавление иммунного ответа в микроокружении опухоли, приводя к терапевтическому противоопухолевому иммунному ответу.

Благодаря синергизму между TREM2 и CSF1 и между макрофагами, нацеленными на опухоль, и макрофагами, нацеленными на Т-клетки, в некоторых вариантах реализации изобретения способы предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего рак, дополнительно включают введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку. Примеры антител, которые специфически связываются с молекулой, ингибирующей контрольную точку, включают, не ограничиваясь ими, антитело к PD-L1, антитело к CTLA4, антитело к PD-L2, антитело к PD-1, антитело к B7-H3, антитело к B7-H4 и антитело к HVEM, антитело к BTLA, антитело к GAL9, антитело к TIM3, антитело к A2AR, антитело к LAG-3, антитело к фосфатидилсерину и любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку, вводят в комбинации с антагонистическим антителом к TREM2 и/или антагонистическим антителом к DAP12 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак, который следует предотвратить или излечить с помощью способов по настоящему описанию, включает, но не ограничивается ими, плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легких и плоскоклеточный рак легких, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта или рак желудка, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или карциному матки, карциному слюнных желез, рак почки, или ренальный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, карциному полового члена, меланому, поверхностно распространяющуюся меланому, меланому типа злокачественного лентиго, акральную лентигинозную меланому, узелковые меланомы, множественную миелому и В-клеточную лимфому; хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); лейкоз ворсистых клеток; хронический миелобластный лейкоз; и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (ПТЛР), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факоматозами, отек (например, связанный с опухолями головного мозга), синдромом Мейгса, рак головного мозга, а также рак головы и шеи и связанные с ними метастазы. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения рак выбран из немелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, нейробластомы, карциномы почек, рака мочевого пузыря, рака яичника, меланомы, карциномы молочной железы, рака желудка и гепатоцеллюлярной карциномы. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах реализации изобретения раком может быть рак на ранней стадии или рак на поздней стадии. В некоторых вариантах реализации изобретения раком может быть первичная опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения раком может быть метастатическая опухоль на вторичном сайте, возникшая от любого из вышеуказанных типов рака.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию могут быть использованы для предотвращения, снижения риска или лечения рака, включая, без ограничений, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки и прямой кишки, рак эндометрия, рак почек, ренальный рак, рак почечной лоханки, лейкемию, рак легких, меланому, неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, фибросаркому и рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее описание предлагает способы для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего рак, путем введения индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к TREM2 и/или антитела к DAP12 по настоящему описанию.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку, и/или другую стандартную или экспериментальную противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку, вводится в комбинации с выделенным ан-

тителом. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку, является выбранным из группы, состоящей из антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к PD-L2, антитела к PD-1, антитела к B7-H3, антитела к B7-H4, антитела к HVEM, антитела к аттенуатору В- и Т-лимфоцитов (BTLA) антитела к рецептору подавления цитотоксичности (KIR), антитела к GAL9, антитела к TIM3, антитела к A2AR, антитела к LAG-3, антитела к фосфатидилсерину, антитела к CD27, и любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения стандартная или экспериментальная противоопухолевая терапия представляет собой одну или более терапий, выбранных из радиотерапии, химиотерапии, целевой терапии, иматиниба (Gleevec®), трастузумаба (Herceptin®), адаптивного переноса клеток (ACT), переноса химерного антигенного рецептора Т-клеток (CAR-T), вакцинотерапии и цитокиновой терапии.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, вводится в комбинации с выделенным антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином является выбранным из антитела к CCL2, антитела к КСФ-1, антитела к ИЛ-2 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком вводится в комбинации с выделенным антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком является выбранным из агонистического антитела к CD40, агонистического антитела к OX40, агонистического антитела к ICOS, агонистического антитела к CD28, агонистического антитела к CD137/4-1BB, агонистического антитела к CD27, агонистического антитела к глюкокортикоид-индуцированному TNFR-связанному белку GITR и любой их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает введение индивидууму по меньшей мере одного стимулирующего цитокина. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один стимулирующий цитокин вводится в комбинации с выделенным антителом. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один стимулирующий цитокин является выбранным из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-8, СРБ, ИФН- α , ИФН- β , ИЛ-2, ИЛ-18, ГМ-КСФ, Г-КСФ и любой их комбинации.

Комплекты/изделия.

Настоящее описание также относится к комплектам, содержащим выделенное антитело по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12, описанное в данном документе) или его функциональный фрагмент. Комплекты по настоящему описанию могут включать один или более контейнеров, содержащих очищенное антитело по настоящему описанию. В некоторых вариантах реализации изобретения комплекты дополнительно включают инструкции по применению в соответствии со способами настоящего описания. В некоторых вариантах реализации изобретения эти инструкции содержат описание введения выделенного антитела по настоящему описанию (например, антитела к TREM2 или антитела к DAP12, описанного в данном документе) для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранную из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хаккола и рассеянного склероза в соответствии с любым из способов данного описания.

В некоторых вариантах реализации изобретения инструкции содержат описание того, как определять TREM2 и/или DAP12, например, у индивидуума в образце ткани или в клетке. Комплект может дополнительно содержать описание отбора индивидуума, подходящего для лечения, на основе определения того, имеет ли данный индивидуум заболевание и стадии заболевания.

В некоторых вариантах реализации изобретения комплекты могут дополнительно включать другое антитело по настоящему описанию (например, по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой, ингибирующей контрольную точку по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, и/или по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком) и/или по меньшей мере один стимулирующий цитокин. В некоторых вариантах реализации изобретения комплекты могут дополнительно включать инструкции для использования антитела и/или стимулирующего цитокина в комбинации с выделенным антителом по настоящему описанию (например, агонистическим антителом к TREM2, описанным в данном документе), инструкции по применению выделенного антитела по настоящему описанию в комбинации с антителом и/или стимулирующим цитокином или инструк-

ции по применению выделенного антитела по настоящему описанию и антитела, и/или стимулирующего цитокина в соответствии с любым из способов данного описания.

Как правило, инструкции включают информацию о дозировке, схеме применения и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть в виде единичных доз, многодозовых упаковок (например, упаковки для многократного приема) или субъединичных доз. Инструкции, поставляемые в комплектах по настоящему описанию, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше в упаковке (например, бумажном листе, включенным в комплект), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции, записанные на магнитном или оптическом накопительном диске) также являются приемлемыми.

На этикетке или листке-вкладыше в упаковке указано, что композицию используют для лечения, например, заболевания по настоящему описанию. Инструкции могут быть предложены для практического применения любого из описанных в данном документе способов.

Комплекты по этому описанию находятся в пригодной упаковке. Пригодная упаковка включает, но не ограничивается ими, флаконы, бутылки, сосуды, гибкую упаковку (например, герметические майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Также рассматриваются упаковки, предназначенные для использования в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как мини-насос. Комплект может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенных растворов или флакон, имеющий пробку, прокальваемую иглой для подкожной инъекции). Контейнер также может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенных растворов или флакон, имеющий пробку, прокальваемую иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный препарат в композиции представляет собой выделенное антитело по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12, описанное в данном документе). Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный препарат.

Контейнеры могут необязательно предлагать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующую информацию. Как правило, комплект содержит контейнер и связанную с контейнером или находящуюся на нем этикетку или вкладыш в упаковке.

Диагностическое применение.

Выделенные антитела по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12, описанное в данном документе) также имеют диагностическую ценность. Таким образом, данное описание предлагает способы использования антител по этому описанию или их функциональных фрагментов для диагностических целей, таких как обнаружение TREM2 и/или DAP12 у индивидуума или в образцах тканей, полученных от индивидуума.

В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является пациентом, страдающим или подверженным риску развития деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хаккола, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, рассеянного склероза или рака. В некоторых вариантах реализации изобретения диагностические способы включают обнаружение TREM2 и/или DAP12 в биологическом образце, таком как образец биопсии, ткань или клетка. Выделенное антитело по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12 описанное в данном документе) контактирует с биологическим образцом и обнаруживает связанное с антигеном антитело. Например, образец ткани (например, образец биопсии) может быть окрашен с помощью антитела к TREM2 или антитела к DAP12, описанного в данном документе, для обнаружения и/или количественного определения связанных с заболеванием макрофагов (например, макрофаги типа M2). Способ обнаружения может включать количественное определение связанного с антигеном антитела. Обнаружение антител в биологических образцах может происходить любым способом, известным в данной области техники, включая иммунофлюоресцентную микроскопию, иммуноцитохимию, иммуногистохимию, ИФА, анализ FACS, иммунопреципитацию или микропозитронную эмиссионную томографию. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело является меченым радиоактивным изотопом, например, с ^{18}F и впоследствии обнаруживается с использованием анализа микропозитронной эмиссионной томографии. Связывание антитела также можно количественно определить у пациента с помощью неинвазивных методов, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), рентгеновская компьютерная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), компьютерная томография (КТ) и аксиальная компьютерная томография (АКТ).

В других вариантах реализации изобретения выделенное антитело по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12, описанное в данном документе) может быть использовано для обнаружения и/или количественного определения, например, микроглии в образце головного мозга, взятом из модели доклинического заболевания (например, модели заболевания, не относящейся к человеку). Таким образом, изолированное антитело по настоящему описанию (например, антитело к TREM2 или антитело к DAP12, описанное в данном документе) может быть полезным при оценке терапевтического ответа после лечения в модели для заболевания нервной системы или повреждения, такого

как деменция, лобно-височная деменция, болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола или рассеянный склероз по сравнению с контролем.

Пронумерованные варианты реализации изобретения.

Нижеследующие пронумерованные варианты реализации изобретения представляют собой некоторые аспекты изобретения.

1. Выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками, при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности.

2. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 1, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

3. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 2, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок дикого типа.

4. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 2, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой встречающийся в природе вариант.

5. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-4, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включает связывание TREM2 с DAP12.

6. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-4, отличающееся тем, что одна или более активностей DAP12 включает связывание DAP12 с TREM2.

7. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-6, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают фосфорилирование DAP12.

8. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 7, отличающееся тем, что фосфорилирование DAP12 индуцируется одной или более тирозинкиназами семейства SRC.

9. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-8, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают активацию ФИЗК.

10. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-9, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10.

11. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 10, отличающееся тем, что повышенная экспрессия одного или более противовоспалительных медиаторов возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток и клеток микроглии.

12. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-11, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ-1β, ФНО.

13. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 12, отличающееся тем, что пониженная экспрессия одного или более провоспалительных медиаторов возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток и клеток микроглии.

14. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-13, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK).

15. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-14, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию С-С рецептора хемокина 7 (CCR7).

16. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-15, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21.

17. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-16, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают снижение, нормализацию или обе способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток.

18. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-17, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и то и другое.

19. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-18, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают увеличение выживаемости макрофагов, клеток микроглии или и того и другого.

20. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-19, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают

увеличение функции макрофагов, клеток микроглии или и того и другого.

21. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-20, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию одного или более типов клиренса без воспаления, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов без воспаления, клиренса дебриса нервной ткани без воспаления, клиренса дебриса не нервной ткани без воспаления, клиренса бактерий или других инородных тел без воспаления и клиренса болезнетворного белка без воспаления.

22. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-21, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию фагоцитоза без воспаления одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел или болезнетворных белков без воспаления.

23. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 22, отличающееся тем, что болезнетворный белок выбран из группы, состоящей из пептида А бета, белка альфа-синуклеина, Тау белка, белка TDP-43, прионного белка и белка хантингтина.

24. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-23, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают нормализацию нарушенной экспрессии генов, которая зависит от TREM2/DAP12.

25. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-24, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают вовлечение Syk, ZAP70, или и того и другого к DAP12.

26. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-25, отличающееся тем, что выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- i. аминокислотных остатков 29-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-112 из SEQ ID NO: 1;
- ii. аминокислотных остатков 29-41 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-41 из SEQ ID NO: 1;
- iii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 40-44 из SEQ ID NO: 1;
- iv. аминокислотных остатков 47-69 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 47-69 из SEQ ID NO: 1;
- v. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 67-76 из SEQ ID NO: 1;
- vi. аминокислотных остатков 76-86 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 76-86 из SEQ ID NO: 1;
- vii. аминокислотных остатков 91-100 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 91-100 из SEQ ID NO: 1;
- viii. аминокислотных остатков 99-115 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 99-115 из SEQ ID NO: 1;
- ix. аминокислотных остатков 104-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 104-112 из SEQ ID NO: 1; и
- x. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 114-118 из SEQ ID NO: 1.

27. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-25, отличающееся тем, что выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- i. аминокислотных остатков Arg47 или Asp87 из SEQ ID NO: 1; ii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1; iii. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1; и iv. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1.

28. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-25, отличающееся тем, что выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком DAP12, связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 22-40 из SEQ ID NO: 2 или аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам 22-40 из SEQ ID NO: 2.

29. Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-25, отличающееся тем, что выделенное агонистическое антитело является биспецифическим антителом, которое связывается с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из:

- i. одного или более аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 1; и

ii. одного или более аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2, или аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 2.

30. Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело.

31. Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

32. Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека.

33. Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 32, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

34. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения.

35. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту реализации изобретения 34.

36. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту реализации изобретения 35.

37. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту реализации изобретения 36, сопровождающееся продукцией антитела.

38. Способ по варианту реализации изобретения 37, дополнительно содержащий выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-33, и фармацевтически приемлемый носитель.

40. Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-33.

41. Способ по варианту реализации изобретения 40, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1;

ii. замены глутамина на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1;

iii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1;

iv. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1

v. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1;

vi. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1;

vii. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и

viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1.

42. Способ по варианту реализации изобретения 40, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию.

43. Способ по варианту реализации изобретения 40, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2;

ii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2;

iii. делеции в пределах экзона 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID

NO: 2;

iv. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и

v. нуклеотидной делеции гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

Выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками, при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 44, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 45, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок дикого типа.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 45, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой встречающийся в природе вариант.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-47, отличающееся тем, что выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2, кластеризацию DAP12 или кластеризацию и того и другого на поверхности клетки.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-48, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включает связывание TREM2 с DAP12.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-48, отличающееся тем, что одна или более активностей DAP12 включает связывание DAP12 с TREM2.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-50, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают фосфорилирование DAP12, фосфорилирование TREM2 или фосфорилирование и того и другого.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 51, отличающееся тем, что фосфорилирование DAP12, фосфорилирование TREM2 или фосфорилирование и того и другого индуцируется одной или более тирозинкиназами семейства SRC.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 52, отличающееся тем, что одна или более тирозинкиназ семейства SRC содержат киназу Syk.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-53, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают активацию ФИЗК.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-54, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-54, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию одного или более противовоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 55 или варианту реализации изобретения 56, отличающееся тем, что повышенная экспрессия возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-57, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-57, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ИЛ-1β, ФНО, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-58, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженную экспрессию ФНО-α, ИЛ-6 или и того и другого.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 58 или варианту реализации изобретения 60, отличающееся тем, что пониженная экспрессия одного или более провоспалительных медиаторов возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-60, отличающееся-

ся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-62, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию С-С рецептора хемокина 7 (CCR7).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-63, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-64, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают усиление, нормализацию или обе способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-65, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-66, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают увеличение выживаемости макрофагов, клеток микроглии, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-67, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают увеличение функции макрофагов, клеток микроглии, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и/или клеток Купфера

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 67 или варианту реализации изобретения 68, отличающееся тем, что макрофаги и/или клетки микроглии представляют собой макрофаги и/или клетки микроглии M1, макрофаги и/или клетки микроглии M2, или и те и другие.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 69, отличающееся тем, что макрофаги и/или клетки микроглии M1 представляют собой активированные макрофаги и/или клетки микроглии M1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-68, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дбриса нервной ткани, клиренса дбриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворного белка, клиренса болезнетворного пептида и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-71, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают индукцию фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дбриса нервной ткани, дбриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворных нуклеиновых кислот.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 71 или варианту реализации изобретения 72, отличающееся тем, что болезнетворный белок выбран из группы, состоящей из бета-амилоида, Tau, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида А, медины, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 71 или варианту реализации изобретения 72, отличающееся тем, что болезнетворная нуклеиновая кислота представляет собой бессмысловую РНК экспансии повторов GGCCCC (G2C4).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-74, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают нормализацию нарушенной экспрессии генов, которая зависит от TREM2/DAP12.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-75, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают вовлечение Syk, ZAP70, или и того и другого к комплексу DAP12/TREM.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-76, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают фосфорилирование Syk.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-77, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-78, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженное выделение одного или более воспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 79, отличающееся тем, что один или более воспалительных цитокинов выбраны из группы, состоящей из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, МХБ-1, ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-1 β , ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17 и ИЛ-18.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-79, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 81, отличающееся тем, что один или более воспалительный рецептор содержит CD86.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-82, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают увеличение фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-82, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, включают понижение фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-84, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают повышенную активность одного или более TREM2-зависимых генов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 85, отличающееся тем, что один или более TREM2-зависимых генов, включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-86, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 87, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 87, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 89, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 90, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 89-91, отличающееся тем, что антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, независимо от связывания с Fc-рецептором.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 89-91, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 93, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (Fc γ IIВ).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 93 или варианту реализации изобретения 94, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область, которая содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 95, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 96, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 90, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 87, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 99, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 100, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 99-101, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 102, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIB).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 101-103, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 104, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 105, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 101-103, отличающееся тем, что антитело включает константный домен тяжелой цепи I(CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 107, отличающееся тем, что CH1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE

STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT

YTCNVNDHKPS NTKVDKTVRKCCVECPSP (SEQ ID NO: 397).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 107 или варианту реализации изобретения 108, отличающееся тем, что Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации, изобретения 99, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 87, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 111, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 112, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 111-113, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 114, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIB).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 113-115, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 116, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 117, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 87, отличающееся тем, что антитело имеет гибридный изотип IgG2/4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 119, отличающееся тем, что антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 111, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 мыши.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-121, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека, и встречающегося в природе варианта DAP12 че-

ловека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 122, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное инертное антитело, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками.

Выделенное антагонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 124 или варианту реализации изобретения 125, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 126, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой белок дикого типа.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 126, отличающееся тем, что белок TREM2, белок DAP12 или и тот и другой белок представляет собой встречающийся в природе вариант.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 125-128, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 129, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают пониженную активность одного или более TREM2-зависимых генов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 130, отличающееся тем, что один или более TREM2-зависимых генов, включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 129-131, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности включают снижение выживаемости макрофагов, клеток микроглии, макрофагов M1, клеток микроглии M1, макрофагов M2, клеток микроглии M2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 125-132, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 124-133, отличающееся тем, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 134, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 135, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 136, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 137, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 138, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 139, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 140, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 135, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 134, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 143, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 144, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 145, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 146, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 147, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 134, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 149, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 150, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 151, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 152, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 153, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 124-154, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 155, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 106, варианту реализации изобретения 140 или варианту реализации изобретения 141, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 95-157, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 118 или варианту реализации изобретения 154, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-159, отличающееся тем, что выделенное антитело конкурирует за связывание с TREM2 с одним или более лигандами TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 160, отличающееся тем, что один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из клеток *E.coli*, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерионных липидов, отрицательно заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и липидированного амилоидного бета пептида.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-161, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-162, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 163, отличающееся тем, что первый антиген представляет собой TREM2 человека или его встречающийся в природе вариант, или DAP12 человека или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет собой болезнетворный белок, выбранный из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-

синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутаза, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR); или белок, специфический по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, выбранный из группы, состоящей из рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-161, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека; и причем антитело используется в комбинации с одним или более антителами, которые специфически связываются с болезнетворным белком, выбранным из группы, состоящей из: бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутаза, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR) и любой их комбинации.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-165, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-166, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с белком TREM2, и причем выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- i. аминокислотных остатков 29-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-112 из SEQ ID NO: 1;
- ii. аминокислотных остатков 29-41 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 29-41 из SEQ ID NO: 1;
- iii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 40-44 из SEQ ID NO: 1;
- iv. аминокислотных остатков 47-69 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 47-69 из SEQ ID NO: 1;
- v. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 67-76 из SEQ ID NO: 1;
- vi. аминокислотных остатков 76-86 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 76-86 из SEQ ID NO: 1;
- vii. аминокислотных остатков 91-100 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 91-100 из SEQ ID NO: 1;
- viii. аминокислотных остатков 99-115 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 99-115 из SEQ ID NO: 1;
- ix. аминокислотных остатков 104-112 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 104-112 из SEQ ID NO: 1; и
- x. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 114-118 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 167, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 167, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-167, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-167, отличаю-

шееся тем, что выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-167, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с эпитопом, содержащим один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- i. аминокислотных остатков Arg47 или Asp87 из SEQ ID NO: 1;
- ii. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1;
- iii. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1; и
- iv. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-167, отличающееся тем, что выделенное антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 22-40 из SEQ ID NO: 2 или аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам 22-40 из SEQ ID NO: 2.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-167, отличающееся тем, что выделенное антитело является биспецифическим антителом, которое связывается с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из:

- i. одного или более аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 1; и
- ii. одного или более аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 2, или аминокислотных остатков на белке DAP12, соответствующих аминокислотным остаткам из SEQ ID NO: 2.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-174, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела At52; и/или в котором вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела At52.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 175, отличающееся тем, что HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 398.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 175 или варианту реализации изобретения 176, отличающееся тем, что HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 399.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 175-177, отличающееся тем, что HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 400.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 175-178, отличающееся тем, что HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 401.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 175-179, отличающееся тем, что HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 402.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 175-180, отличающееся тем, что HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-174, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит:

(a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 398, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 398;

(b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 399, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 399; и

(c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 400, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 400; и/или

в котором вариабельный домен легкой цепи содержит:

(a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 401, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 401;

(b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 402, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 402; и

(c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 403.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-174, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен

(a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 407;

(b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 408; и

(c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 409.

Выделенное антитело к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат52.

Выделенное антитело к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат21.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-210, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой агонистическое антитело, и в котором антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 211, отличающееся тем, что выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2, кластеризацию DAP12 или кластеризацию и того и другого на поверхности клетки.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 211 или варианту реализации изобретения 212, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности выбраны из группы, состоящей из: связывания TREM2 с DAP12; связывания DAP12 с TREM2; фосфорилирования TREM2, фосфорилирования DAP12; активации ФИЗК; повышенной экспрессии одного или более противовоспалительных медиаторов; пониженной экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов; пониженной экспрессии ФНО- α , ИЛ-6 или и того и другого; фосфорилирования киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK); повышенной экспрессии С-С рецептора хемокина 7 (CCR7); индукции хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличения, нормализации, или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукции продуцирования остеокластов, увеличения уровня остеокластогенеза или и того и другого; увеличения выживаемости и/или функции одной или более дендритных клеток, макрофагов, клеток микроглии, макрофагов и/или клеток микроглии М1, активированных макрофагов и/или клеток микроглии М1, макрофагов и/или клеток микроглии М2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера; индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дегрифта нервной ткани, клиренса дегрифта не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворного белка, клиренса болезнетворного пептида и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты; индукции фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дегрифта нервной ткани, дегрифта не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворных нуклеиновых кислот; нормализации нарушенной TREM2/DAP12-зависимой генной экспрессии; вовлечения Syk, ZAP70 или и того и другого в комплекс DAP12/TREM2; фосфорилирования Syk; повышенной экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках; пониженной секреции одного или более воспалительных цитокинов; пониженной экспрессии одного или более воспалительных рецепторов; повышения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; понижения фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях нормальных уровней МКСФ; повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов; и любой их комбинации.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 211-213, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 214, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 215, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 216, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 217, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 216-218, отличающееся тем, что антитело индуцирует одну или более активностей TREM2, активностей DAP12 или обе активности, независимо от связывания с Fc-рецептором.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 216-218, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 220, отличающееся тем, что ингиби-

рующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 220 или варианту реализации изобретения 221, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 222, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 223, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 217, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 215, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 226, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 227, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 226-228, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 229, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 228-230, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 231, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 232, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 228-230, отличающееся тем, что антитело включает константный домен тяжелой цепи 1(CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 234, отличающееся тем, что CH1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE

STAAAGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT

YTCNVNDHKPS NTKVDKTVKCCVCEPPCP (SEQ ID NO: 397).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 234 или варианту реализации изобретения 235, отличающееся тем, что Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 226, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 215, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 238, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 239, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 238-240, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 241, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 240-242, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 243, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 244, отличающееся тем, что одна или

более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 214, отличающееся тем, что антитело имеет гибридный изотип IgG2/4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 246, отличающееся тем, что антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 239, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 мыши.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 211-248, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека, и встречающегося в природе варианта DAP12 человека, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 249, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-210, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой инертное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-210, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 252, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 253, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из снижения активности одного или более TREM2-зависимых генов; снижения активности одного или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); снижения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток; и любой их комбинации.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 252-254, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 251-255, отличающееся тем, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 256, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 257, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 258, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 259, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 260, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 261, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 262, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 257, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 256, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 264, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 266, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 267, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 268, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 269, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 256, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 271, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 272, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 273, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 274, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 275, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 208-276, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 277, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 233, варианту реализации изобретения 262 или варианту реализации изобретения 263, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 223-279, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 245 или варианту реализации изобретения 276, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-281, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-282, отличающееся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 191-283, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело специфически связывается как с TREM2 человека, так и с TREM2 мыши.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для TREM2 человека и TREM2 мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 5,75 нМ до менее чем около 0,09 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 1,51 нМ до менее чем около 0,35 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для мономерного белка TREM2 человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 5,75 нМ до менее чем около 1,15 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 0,23 нМ до менее чем около 0,09 нМ.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения.

Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту реализации изобретения 290.

Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту реализации изобретения 291.

Способ получения антитела, включающий культивирование клетки по варианту реализации изобретения 292, сопровождающееся продукцией антитела.

Способ по варианту реализации изобретения 293, дополнительно содержащий выделение антитела, продуцируемого клеткой.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-289 и фармацевтически приемлемый носитель.

Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранные из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола и рассеянного склероза, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или с обоими белками.

Способ по варианту реализации 296, отличающийся тем, что выделенное антитело представляет собой выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-289.

Способ по варианту реализации изобретения 296 или варианту реализации изобретения 297, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1;

ii. замены глутамин на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1;

iii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1;

iv. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1;

v. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1;

vi. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1;

vii. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и

viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1.

Способ по варианту реализации изобретения 296, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию.

Способ по варианту реализации изобретения 296, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2;

ii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2;

iii. делеции в пределах экзона 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2;

iv. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и

v. нуклеотидной делеции гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

Способ индуцирования или стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток индивидуума, нуждающегося в этом, содержащий введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела, которое связывается с белком TREM2, белком DAP12 или обоими белками.

Способ по варианту реализации 301, отличающийся тем, что выделенное агонистическое антитело представляет собой выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 44-123, 157-250 и 277-289.

Выделенное агонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2, при этом антитело индуцирует одну или более активностей TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 303, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 304, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой белок дикого типа.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 304, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой встречающийся в природе вариант.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-306, отличающееся тем, что белок TREM2 экспрессируется на дендритных клетках человека, макрофагах человека, моноцитах человека, остеокластах человека, клетках Лангерганса кожи человека, клетках Купфера человека и/или микроглии человека.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-307, отличающееся тем, что выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2 на поверхности клетки.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-308, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включает связывание TREM2 с DAP12.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-309, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включает аутофосфорилирование TREM2.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-310, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включает фосфорилирование DAP12.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 310 или варианту реализации изобретения 311, отличающееся тем, что фосфорилирование TREM2, фосфорилирование DAP12 или фосфорилирование и того и другого является индуцированным одной или более тирозинкиназами семейства SRC.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 312, отличающееся тем, что одна или более тирозинкиназ семейства SRC содержат киназу Syk.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-313, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают активацию ФИЗК.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-314, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную экспрессию одного или более провоспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-314, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную экспрессию одного или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 315 или варианту реализации изобретения 316, отличающееся тем, что повышенная экспрессия возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-317, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-317, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженную экспрессию одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-318, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженную экспрессию ФНО- α , ИЛ-6 или и того и другого.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 319 или варианту реализации изобретения 320, отличающееся тем, что пониженная экспрессия одного или более провоспалительных медиаторов возникает в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и клеток микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-320, отличаю-

шееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-322, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную экспрессию С-С рецептора хемокина 7 (CCR7).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-322, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-324, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную способность дендритных клеток, моноцитов, микроглии и/или макрофагов индуцировать пролиферацию Т-клеток.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-324, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают усиление, нормализацию или обе способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-326, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают индукцию продуцирования остеокластов, повышенный уровень остеокластогенеза или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-327, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают увеличение выживаемости дендритных клеток, макрофагов, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-328, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают увеличение функции дендритных клеток, макрофагов и/или микроглии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-329, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают увеличение фагоцитоза дендритными клетками, макрофагами, моноцитами и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-330, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают понижение фагоцитоза дендритными клетками, макрофагами, моноцитами и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ.

Выделенное антитело по любому варианту реализации изобретения 328-331, отличающееся тем, что макрофаги и/или микроглия представляют собой макрофаги и/или микроглию М1, макрофаги и/или микроглию М2, или и те, и другие.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 332, отличающееся тем, что макрофаги и/или микроглия М1 представляют собой активированные макрофаги и/или микроглию М1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-333, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса апоптотических нейронов, клиренса дебриса нервной ткани, клиренса дебриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса безвредного белка и клиренса опухолевой клетки.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-334, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают индукцию фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, безвредных белков, безвредных пептидов, безвредных нуклеиновых кислот или опухолевых клеток.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 335, отличающееся тем, что безвредная нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК экспансии повторов GGGCC (G2C4).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 334 или варианту реализации изобретения 335, отличающееся тем, что безвредный белок выбран из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрий-уретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, апополипротеина AI, сывороточного амилоида А, медины, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-337, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают нормализацию нарушенной экспрессии генов, которая зависит от TREM2/DAP12.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-338, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают вовлечение Syk, ZAP70, или и того и другого к комплексу DAP12/TREM.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-339, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают фосфорилирование Syk.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-340, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную экспрессию CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах или на том и другом.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 341, отличающееся тем, что дендритные клетки представляют собой дендритные клетки костного мозга.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-342, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженное выделение одного или более воспалительных цитокинов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 343, отличающееся тем, что один или более воспалительных цитокинов выбраны из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-b, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, СРБ и МХБ-1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-344, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженную экспрессию одного или более воспалительных рецепторов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 345, отличающееся тем, что один или более воспалительный рецептор содержит CD86.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-346, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают повышенную активность одного или более TREM2-зависимых генов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 347, отличающееся тем, что один или более TREM2-зависимых генов, включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-348, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 349, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 349, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 351, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 352, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 351-353, отличающееся тем, что антитело индуцирует одну или более активностей TREM2 независимо от связывания с Fc-рецептором.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 351-353, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 355, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIb (Fc γ IIb).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 355 или варианту реализации изобретения 356, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область, которая содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 357, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 358, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 352, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 349, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 361, отличающееся тем, что антитело

содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 362, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 361-363, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 364, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIB).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 363-365, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 366, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 367, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 363-365, отличающееся тем, что антитело включает константный домен тяжелой цепи 1(CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 369, отличающееся тем, что CH1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE

STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT

YTCNVNDHKPS NTKVDKTVERKCCVECPSP (SEQ ID NO: 397).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 369 или варианту реализации изобретения 370, отличающееся тем, что Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 361, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 349, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 373, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 374, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 373-375, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 376, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIB).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 375-377, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 378, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 379, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 349, отличающееся тем, что антитело имеет гибридный изотип IgG2/4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 381, отличающееся тем, что антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 373, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 мыши.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 1-383, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 человека при патологии, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или

более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 человека при патологии.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 384, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное инертное антитело, которое связывается с белком TREM2.

Выделенное антагонистическое антитело, которое связывается с белком TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 386 или варианту реализации изобретения 387, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой белок млекопитающего или белок человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 388, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой белок дикого типа.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 388, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой встречающийся в природе вариант.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 388, отличающееся тем, что белок TREM2 представляет собой вариант при патологии.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 387-391, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 392, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают пониженную активность одного или более TREM2-зависимых генов.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 393, отличающееся тем, что один или более TREM2-зависимых генов, включают один или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 392-394, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 включают снижение выживаемости макрофагов, клеток микроглии, макрофагов M1, клеток микроглии M1, макрофагов M2, клеток микроглии M2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 387-395, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 386-396, отличающееся тем, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 397, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 398, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 399, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 400, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 401, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 402, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 403, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 398, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 397, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 406, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 407, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 408, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 409, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 410, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 397, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 412, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 413, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 414, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 415, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 416, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 386-417, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 при патологии.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 418, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 368, варианту реализации изобретения 403 или варианту реализации изобретения 404, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 357-420, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 380 или варианту реализации изобретения 417, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает аминокислотную замену S228P в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-422, отличающееся тем, что антитело конкурирует за связывание с TREM2 с одним или более лигандами TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 423, отличающееся тем, что один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из клеток E.coli, апоптотических клеток, нуклеиновых кислот, анионных липидов, цвиттерионных липидов, отрицательно заряженных фосфолипидов, фосфатидилсерина, сульфатидов, фосфатидилхолина, сфингомиелина, мембранных фосфолипидов, липидированных белков, протеолипидов, липидированных пептидов и липидированного амилоидного бета пептида.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-422, отличающееся тем, что антитело не конкурирует за связывание TREM2 с лигандом TREM2.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-425, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело, конъюгированное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-426, отличающееся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 427, отличающееся тем, что первый антиген представляет собой TREM2 человека или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет собой болезнетворный белок, выбранный из группы, состоящей из: бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипептида А1, сывороточного амилоида А, медиана, пролактин, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоции-

рованных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR); белка, специфического по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, выбранного из группы, состоящей из: рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1; или лигандов и/или белков, экспрессируемых иммунными клетками, причем лиганды и/или белки, выбраны из группы, состоящей из: CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG и фосфатидилсерина.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 427, отличающееся тем, что первый антиген представляет собой TREM2 человека или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет белок, экспрессируемый на одной или более опухолевых клетках.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-424, отличающееся тем, что антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека, DAP12 человека и встречающегося в природе варианта DAP12 человека; и причем антитело используется в комбинации с одним или более антителами, которые специфически связываются с болезнетворным белком, выбранным из группы, состоящей из: бета-амилоида, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA), и пептидов повтора пролин-аргинин (PR) и любой их комбинации, и/или одного или более антител, которые специфически связывают связанный с раком белок, выбранный из группы, состоящей из: CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG, фосфатидилсерина и любых их комбинаций.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-430, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-431, отличающееся тем, что антитело связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- xi. аминокислотных остатков 130-171 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 130-171 из SEQ ID NO: 1;
- xii. аминокислотных остатков 140-153 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-153 из SEQ ID NO: 1;
- xiii. аминокислотных остатков 139-146 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 139-146 из SEQ ID NO: 1;
- xiv. аминокислотных остатков 130-144 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 130-144 из SEQ ID NO: 1; и
- xv. аминокислотных остатков 158-171 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 158-171 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-431, отличающееся тем, что антитело связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот в пределах аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- i. аминокислотных остатков 130-171 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 130-171 из SEQ ID NO: 1;
- ii. аминокислотных остатков 140-153 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 139-153 из SEQ ID NO: 1;
- iii. аминокислотных остатков 139-146 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 139-146 из SEQ ID NO: 1;
- iv. аминокислотных остатков 130-144 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 130-144 из SEQ ID NO: 1; и
- v. аминокислотных остатков 158-171 из SEQ ID NO: 1, или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 158-171 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 432 или варианту реализации изобретения 433, отличающееся тем, что антитело связывается с эпитопом дополнительно содержащим один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- v. аминокислотных остатков Arg47 или Asp87 из SEQ ID NO: 1;
- vi. аминокислотных остатков 40-44 из SEQ ID NO: 1;
- vii. аминокислотных остатков 67-76 из SEQ ID NO: 1; и

viii. аминокислотных остатков 114-118 из SEQ ID NO: 1.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-433, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи. причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87, и/или причем вариабельный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 435, отличающееся тем, что HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 435 или варианту реализации изобретения 436, отличающееся тем, что HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 435-437, отличающееся тем, что HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 435-438, отличающееся тем, что HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 435-439, отличающееся тем, что HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 435-440, отличающееся тем, что HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-433, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит:

(a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24;

(b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49; и

(c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119; и/или;

в котором вариабельный домен легкой цепи содержит:

(a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137;

(b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152; и

(c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152.

Выделенное антитело к TREM2 человека, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87, и/или причем переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела, выбранного из группы, состоящей из: At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 443, отличающееся тем, что HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 443 или варианту реализации изобретения 444, отличающееся тем, что HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-445, отличающееся тем, что HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-446, отличающееся тем, что HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-447, отличающееся тем, что HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-448, отличающееся тем, что HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 443, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, в котором переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119, и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236.

Выделенное антитело к TREM2 человека, которое связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из: At1, At2, At3, At4, At5, At6, At7, At8, At9, At10, At11, At12, At13, At14, At15, At16, At17, At18, At19, At20, At22, At23, At24, At25, At26, At27, At28, At29, At30, At31, At32, At33, At34, At35, At36, At37, At38, At39, At40, At41, At42, At43, At44, At45, At46, At47, At48, At49, At50, At51, At53, At54, At55, At56, At57, At58, At59, At60, At61, At62, At63, At64, At65, At66, At67, At68, At69, At70, At71, At72, At73, At74, At75, At76, At77, At78, At79, At80, At81, At82, At83, At84, At85, At86 и At87.

Выделенное антитело к TREM2 человека, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит:

(a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-24;

(b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25-49; и

(c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей

из SEQ ID NO: 50-119 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-119; и/или

в котором вариабельный домен легкой цепи содержит: (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-137;

(b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152; и

(c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-236 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 138-152.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-452, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой агонистическое антитело, и в котором антитело индуцирует одну или более активностей TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 453, отличающееся тем, что выделенное антитело индуцирует или сохраняет кластеризацию TREM2 на поверхности клетки.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 453 или варианту реализации изобретения 454, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из: связывания TREM2 с DAP12; связывания DAP12 с TREM2; фосфорилирования TREM2, фосфорилирования DAP12; активации ФИЗК; повышенной экспрессии одного или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-12p70, ИЛ-6 и ИЛ-10; пониженной экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18 и СРБ; пониженной экспрессии ФНО-α, ИЛ-6 или и того и другого; фосфорилирования киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK); повышенной экспрессии С-С рецептора хемокина 7 (CCR7); индукции хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличения способности дендритных клеток, моноцитов, микроглии и/или макрофагов индуцировать пролиферацию Т-клеток; увеличения, нормализации, или и той и другой способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; индукции продуцирования остеокластов, увеличения уровня остеокластогенеза или и того и другого; увеличения выживаемости и/или функции одной или более дендритных клеток, макрофагов, макрофагов М1, активированных макрофагов М1, макрофагов М2, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера, клеток микроглии, клеток микроглии М1, активированных клеток микроглии М1 и клеток микроглии М2; индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из клиренса раковых клеток, клиренса апоптотических нейронов, клиренса дебриса нервной ткани, клиренса дебриса не нервной ткани, клиренса бактерий или других инородных тел и клиренса болезнетворного белка; индукции фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков или опухолевых клеток; нормализации нарушенной TREM2/DAP12-зависимой генной экспрессии; вовлечения Syk, ZAP70, или и того и другого в комплекс TREM2/DAP12; фосфорилирования Syk; повышенной экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, микроглии, моноцитах или макрофагах; пониженной секреции одного или более воспалительных цитокинов, выбранных из группы, состоящей из ИФН-а4, ИФН-б, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ИФН-гамма, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, СРБ и МСР-1; пониженной экспрессии одного или более воспалительных рецепторов; повышения фагоцитоза макрофагами, моноцитами, дендритными клетками и/или микроглией в условиях пониженных уровней МКСФ; понижения фагоцитоза макрофагами, моноцитами, дендритными клетками и/или микроглией в присутствии нормальных уровней МКСФ; повышения активности одного или более TREM2-зависимых генов; и любых их комбинации.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 453-455, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 456, отличающееся тем, что антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 457, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 458, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 459, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 458-460, отличающееся тем, что антитело индуцирует одну или более активностей TREM2 независимо от связывания с Fc-рецептором.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 458-461, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 462, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 462 или варианту реализации изобретения 463, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 464, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 465, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 459, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 457, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 468, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 469, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 468-470, отличающееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 471, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIВ).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 470-472, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 473, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 474, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 470-472, отличающееся тем, что антитело включает константный домен тяжелой цепи I(CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 476, отличающееся тем, что CH1 изотипа IgG2, и шарнирная область содержат аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE

STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT

YTCNVNDHKPS NTKVDKTVKCCVCEPPCP (SEQ ID NO:397).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 476 или варианту реализации изобретения 477, отличающееся тем, что Fc-область антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе замены, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 468, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 457, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 480, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 481, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 480-482, отличаю-

шееся тем, что антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 483, отличающееся тем, что ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγIIВ).

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 482-484, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 485, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 486, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 456, отличающееся тем, что антитело имеет гибридный изотип IgG2/4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 488, отличающееся тем, что антитело содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 118 по 260 из IgG2 человека и аминокислоты с 261 по 447 из IgG4 человека, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 481, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 мыши.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 451-490, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 при патологии, и причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 при патологии.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 491, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-452, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой инертное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-452, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой антагонистическое антитело.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 494, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует одну или более активностей TREM2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 495, отличающееся тем, что одна или более активностей TREM2 выбраны из группы, состоящей из снижения активности одного или более TREM2-зависимых генов; снижения активности одного или более ядерных факторов из факторов транскрипции активированных Т-клеток (NFAT); снижения выживаемости макрофагов, клеток микроглии, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи, клеток Купфера и/или дендритных клеток; и любой их комбинации.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 494-496, отличающееся тем, что выделенное антитело ингибирует взаимодействие между TREM2 и одним или более лигандами TREM2, ингибирует передачу сигнала TREM2 или и то и другое.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 493-497, отличающееся тем, антитело не способно связывать Fc-гамма-рецептор (FcγR).

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 498, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG1.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 499, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 500, отличающееся тем, что константная область IgG1 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 501, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 502, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 503, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 504, отличающееся тем, что Fc-область

дополнительно включает делецию аминокислоты в положении, соответствующем глицину 236 в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 499, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG1 мыши.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 498, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG2.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 507, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG2 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 508, отличающееся тем, что константная область IgG2 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 509, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 510, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 511, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 498, отличающееся тем, что антитело имеет изотип IgG4.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 513, отличающееся тем, что антитело содержит константную область IgG4 человека.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 514, отличающееся тем, что константная область IgG4 человека содержит Fc-область.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 515, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более модификаций.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 516, отличающееся тем, что Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 517, отличающееся тем, что одна или более аминокислотных замен в Fc-области находятся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-518, отличающееся тем, что выделенное антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с одним или более белками человека, выбранными из группы, состоящей из TREM2 человека, встречающегося в природе варианта TREM2 человека и варианта TREM2 при патологии.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 519, отличающееся тем, что фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 475, варианту реализации изобретения 504 или варианту реализации изобретения 505, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 465-521, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по варианту реализации изобретения 487 или варианту реализации изобретения 518, отличающееся тем, что Fc-область дополнительно включает аминокислотную замену серина на пролин в положении 228 в соответствии с нумерацией EU.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-523, отличающееся тем, что антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-524, отличающееся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

Выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 443-525, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело специфически связывается как с TREM2 человека, так и с

TREM2 мыши.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для TREM2 человека и TREM2 мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 6,70 нМ до менее чем около 0,23 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 0,71 нМ до менее чем около 0,23 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для мономерного белка TREM2 человека, которая находится в диапазоне от менее чем около 6,70 нМ до менее чем около 0,66 нМ.

Выделенное антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающееся тем, что выделенное антитело имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка TREM2-Fc мыши, которая находится в диапазоне от менее чем около 4,90 нМ до менее чем около 0,35 нМ.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения.

Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту реализации изобретения 532.

Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту реализации изобретения 533.

Способ получения антитела, включающий культивирование клетки по варианту реализации изобретения 534, сопровождающееся продукцией антитела.

Способ по варианту реализации изобретения 535, дополнительно содержащий выделение антитела, продуцируемого клеткой.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-531 и фармацевтически приемлемый носитель.

Способ предупреждения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или травму, выбранный из группы, состоящей из деменции, лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, мультиинфарктной деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона, таупатии, болезни Насу-Хакола, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, заживления ран, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, ожирения, малярии, эссенциального тремора, волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, синдром Шая-Дрейджера, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортикальной базальной ганглионарной дегенерации, острого рассеянного энцефаломиелита, гранулематоза, саркоидоза, болезни старения, эпилептиформных припадков, травмы спинного мозга, черепно-мозговой травмы, возрастной дегенерации желтого пятна, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, волчанки, артрита, рассеянного склероза, низкой плотности костной ткани, остеопороза, остеогенеза, болезни, связанной с остеопорозом, болезни Педжета кости и рака, содержащий введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного антитела, которое связывается с белком TREM2.

Способ индуцирования или стимулирования выживаемости врожденных иммунных клеток или заживление ран индивидуума, нуждающегося в этом, содержащий введение индивидууму терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела, которое связывается с белком TREM2.

Способ по варианту реализации 538 или варианту реализации изобретения 539, отличающийся тем, что выделенное антитело представляет собой:

i. (a) агонистическое антитело;

(b) инертное антитело; или

(c) антагонистическое антитело.

Способ по варианту реализации 540, отличающийся тем, что:

ii. (a) антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA; и/или

iii. (b) антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Способ по варианту реализации изобретения 541, отличающийся тем, что антитело содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области находящихся в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из:

iv. (a) V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации;

v. (b) N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации;

vi. (c) L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации;

vii. (d) N297A, N297Q, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации.

нации;

viii. (e) V234A, G237A, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации; или

ix. (f) E233P, F234V, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q и любой их комбинации,

x. причем нумерация остатков представлена в соответствии с нумерацией EU.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538-542, отличающийся тем, что выделенное антитело:

xi. (a) связывается с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO: 1; или

xii. (b) одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 из SEQ ID NO: 1 или аминокислотных остатков на белке TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO: 1.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538-543, отличающийся тем, что выделенное антитело:

xiii. (a) связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат52;

xiv. (b) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела Ат52; и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела Ат52;

xv. (c) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 398 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 398, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 399 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 399, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 400, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 400, и/или причем переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 401, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 401, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 402, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 402, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 403, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 403;

xvi. (d) связывает по существу такой же эпитоп TREM2, что и антитело Ат21;

xvii. (e) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и/или HVR-H3 моноклонального антитела Ат21; и/или в котором переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и/или HVR-L3 моноклонального антитела Ат21; или

xviii. (f) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 404 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 404, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 405 или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 405, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 406, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 406, и/или причем переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 407, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 407, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 408, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 408, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 409, или аминокислотную последовательность по меньшей мере с около 95% уровнем гомологии с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 409.

Способ по варианту реализации 538, отличающийся тем, что выделенное антитело представляет собой выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-531.

Способ по варианту реализации 539, отличающийся тем, что выделенное агонистическое антитело представляет собой выделенное антитело по любому одному из вариантов реализации изобретения 303-

385, 420-492 и 519-531.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538 и 540-545, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из:

- viii. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1;
- ix. замены глутамина на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1;
- x. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1;
- xi. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1;
- xii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1;
- xiii. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1;
- xiv. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и
- viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538, 540-545 и 547, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538, 540-545 и 547-548, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из:

- vi. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2;
- vii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2;
- viii. делеции в пределах экзона 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2;
- ix. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и
- x. нуклеотидной делеции гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538 и 540-545, отличающийся тем, что рак является выбранным из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака мозга, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, рака почки, почечно-клеточного рака, лейкоза, рака легких, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, фибросаркомы и рака щитовидной железы.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538 и 540-545, и 550, дополнительно содержащий введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольную точку, и/или другую стандартную или экспериментальную противораковую терапию.

Способ по варианту реализации изобретения 551, отличающийся тем, что по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольную точку, вводится в комбинации с выделенным антителом.

Способ по варианту реализации изобретения 551 или варианту реализации изобретения 552, отличающийся тем, что по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с молекулой ингибирующей контрольную точку, является выбранным из группы состоящей из антитела к PD-L1, антитела к CTLA4, антитела к PD-L2, антитела к PD-1, антитела к B7-H3, антитела к B7-H4, антитела к HVEM, антитела к аттенуатору В- и Т-лимфоцитов (BTLA), антитела к рецептору подавления цитотоксичности (KIR), антитела к GAL9, антитела к TIM3, антитела к A2AR, антитела к LAG-3, антитела к фосфатидилсерину, антитела к CD27, и любой их комбинации.

Способ по варианту реализации изобретения 551, отличающийся тем, что стандартная или экспериментальная противораковая терапия представляет собой одну или более терапий, выбранных из группы, состоящей из радиотерапии, химиотерапии, целевой терапии, иматиниба (Gleevec®), трастузумаба

(Herceptin®), адаптивного переноса клеток (ACT), переноса химерного антигенного рецептора Т-клеток (CAR-T), вакцинотерапии и цитокиновой терапии.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538, 540-545 и 550, дополнительно содержащий введение индивидууму по меньшей мере одного антитела, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином.

Способ по варианту реализации изобретения 555, отличающийся тем, что по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином, вводится в комбинации с выделенным антителом.

Способ по варианту реализации изобретения 555 или варианту реализации изобретения 556, отличающийся тем, что по меньшей мере одно антитело, которое специфически связывается с ингибирующим цитокином является выбранным из группы, состоящей из антитела КСCL2, антитела к КСФ-1, антитела к ИЛ-2 и любой их комбинации.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538, 540-545 и 550, дополнительно содержащий введение индивидууму по меньшей мере одного агонистического антитела, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком.

Способ по варианту реализации изобретения 558, отличающийся тем, что по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком, является введенным в комбинации с выделенным антителом.

Способ по варианту реализации изобретения 558 или варианту реализации изобретения 559, отличающийся тем, что по меньшей мере одно агонистическое антитело, которое специфически связывается со стимулирующим контрольную точку белком является выбранным из группы, состоящей из агонистического антитела к CD40, агонистического антитела к OX40, агонистического антитела к ICOS, агонистического антитела к CD28, агонистического антитела к CD137/4-1BB, агонистического антитела к CD27, агонистического антитела к глюкокортикоид-индуцированному TNFR-связанному белку GITR и любой их комбинации.

Способ по любому одному из вариантов реализации изобретения 538, 540-545 и 550, дополнительно содержащий введение индивидууму по меньшей мере одного стимулирующего цитокина.

Способ по варианту реализации изобретения 561, отличающийся тем, что по меньшей мере один стимулирующий цитокин является введенным в комбинации с выделенным антителом.

Способ по варианту реализации 561 или варианту реализации 562, отличающийся тем, что по меньшей мере один стимулирующий цитокин является выбранным из группы, состоящей из ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ, членов семейств белков хемокинов ТФР-бета, членов семейства ИЛ-20, ИЛ-33, ФИЛ, ОСМ, ЦНФ, ТФР-бета, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-8, СРБ, ИФН- α , ИФН- β , ИЛ-2, ИЛ-18, ГМ-КСФ, Г-КСФ и любой их комбинации.

Данное изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Тем не менее, их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Все ссылки по всему описанию изобретения явным образом включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Продуцирование, идентификация и характеристика агонистических антител к TREM2 и агонистических антител к DAP12.

Введение.

Аминокислотная последовательность белка-предшественника TREM2 человека приведена ниже в SEQ ID NO: 1. TREM2 содержит сигнальный пептид, расположенный в аминокислотных остатках 1-18 из SEQ ID NO: 1. TREM2 человека содержит внеклеточный иммуноглобулинподобный домен варибельного типа (IgV), расположенный в аминокислотных остатках 29-112 из SEQ ID NO: 1; дополнительные внеклеточные последовательности, расположенные в аминокислотных остатках 113-174 из SEQ ID NO: 1; трансмембранный домен, расположенный в аминокислотных остатках 175-195 из SEQ ID NO: 1; и внутриклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 196-230 из SEQ ID NO: 1.

Аминокислотная последовательность TREM2 (SEQ ID NO: 1):

```

      10      20      30      40      50      60
MEPLRLILL FVTELSGAHN TTVFQGVAGQ SLQVSCPYDS MKHWGRRKAW CRQLGEKGPC

      70      80      90     100     110     120
QRVVSTHNLW LLSFLRRWNG STAITDDTLG GTLTITLRNL QPHDAGLYQC QSLHGSEADT

     130     140     150     160     170     180
LRKVLVEVLA DPLDHRDAGD LWFPGESSEF EDAHVEHSIS RSLLEGEIPF PPTSILLLLA

     190     200     210     220     230
CIFLIKILAA SALWAAAWHG QKPGTHPPSE LDCGHDPGYQ LQTLPLGRDT

```

Известной особенностью TREM2 человека является то, что трансмембранный домен TREM2 человека содержит лизин (ак186), который может взаимодействовать с аспарагиновой кислотой в DAP12, ключевым адаптерным белком, который трансдуцирует сигналы от TREM2, TREM1 и других родствен-

ных членов семейства IgV.

Анализ BLAST TREM2 человека выявил 18 родственных гомологов. Эти гомологи включают рецептор естественной клетки-киллера (NK) NK-p44 (NCTR2), рецептор полимерного иммуноглобулина (pIgR), CD300E, CD300A, CD300C и TREML1/TLT1. Ближайший гомолог идентифицировали как NCTR2, имеющий сходство с TREM2 в домене IgV (фиг. 1A). Анализ BLAST также сравнивал белки TREM с другими белками семейства IgV (фиг. 1B).

TREM2 также тесно связан с TREM1. Выравнивание аминокислотных последовательностей TREM1 и TREM2 генерировали с помощью двунаправленного blast (фиг. 2A). Это ограничение также относится к домену IgV.

Ранее были описаны агонистические антитела к TREM1, NK-p44 и других членов этого семейства. Антитела, которые связывают внеклеточный домен TREM2, в частности домен IgV (аминокислотные остатки 29-112 из SEQ ID NO: 1) создаются с использованием мышинной гибридомной технологии, технологии фагового дисплея и технологии дисплея дрожжей. Затем антитела подвергают скринингу на их способность активировать сигнальный путь TREM2 и функции в клетках и в целом животном *in vivo* как описано в примерах 2-39 ниже.

Например, могут быть получены агонистические антитела к TREM2, которые нацелены на домен IgV (аминокислотные остатки 29-112). Домены IgV связываются с мишенями и посредством мультимеризации рецепторов, таких как сам IgG или NKp44, приводят к активации. Таким образом, эти домены являются рациональными мишенями для агонистических антител. Они также являются чрезвычайно дивергентными.

Также могут быть получены агонистические антитела к TREM2, которые нацелены на аминокислотные остатки 99-115 TREM2 человека. Считается, что аминокислотные остатки 99-115 соответствуют пептиду, который блокирует связывание TREM2 с его эндогенной мишенью, поскольку соответствующий пептид в мышинной TREM1 (аминокислотные остатки 83-99) блокирует связывание TREM1 с его эндогенной мишенью (Gibot et al., *Infect. Immunity* 2004). Мышиный пептид TREM1 называется LP17 (LQVTDGLYRCVIYHPP (SEQ ID NO: 414)). Эквивалентная область в человеческом TREM2 расположена в домене CD3 и расположена в аминокислотных остатках 99-115 из SEQ ID NO: 1 (LQPHDAG-LYQCQSLHG). Антитела, которые блокируют связывание лиганда, могут активировать рецепторы, подобные самому лиганду.

Другой подход для прогнозирования релевантного (например, агонистического) сайта в белке TREM2 человека заключается в нацеливании на сайты, в которых обнаружены мутации при болезни Альцгеймера (например, R47H), поликистозной липомембранной остеодисплазии со склерозной лейкоэнцефалопатией (ПЛОСЛ) или болезни Насу-Хакола. Также релевантным является сайт основных мутаций, связанных с заболеванием человека, которые, как правило, обнаруживаются в домене IgV.

Были описаны кристаллические структуры TREM2-родственных структур TREM1 (Kelker, M.S. et al., *J. Mol. Biol.*, 2004. 344(5): p. 1175-81; Kelker, M.S. et al., *J. Mol. Biol.*, 2004. 342(4): p. 1237-48; и Radaev, S. et al., *Structure*, 2003. 11(12): p. 1527-35), TLT1 (Gattis, J.L. et al., *J. Biol. Chem.*, 2006. 281(19): p. 13396-403), и NKp44, и, таким образом, структурные области/особенности определены в домене IgV, которые особенно часто играют центральную роль во взаимодействии с естественными агонистами. Эти исследования подтверждают убеждение, что определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2, CDR3) играют главную роль в связывании лиганда. Сообщается, что TREM1 является мономерным (Gattis, J.L. et al., *J. Biol. Chem.*, 2006. 281(19): p. 13396-403) или димерным (Radaev, S. et al., *Structure*, 2003. 11(12): p. 1527-35) *in vitro* в бесклеточных условиях, но его олигомерное состояние *in vivo* остается неясным, как и TREM2.

Аминокислотная последовательность DAP12 человека приведена ниже в SEQ ID NO: 2:

```

      10      20      30      40      50      60
MGGLEPCSRLL LLLPLLLAVS GLRPVQAQAQ SDCSCSTVSP GVLAGIVMGD LVLTVLIALA

      70      80      90     100     110
VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYK

```

DAP12 представляет собой однопроходной мембранный белок первого типа. Он содержит внеклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 22-40 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2); трансмембранный домен, расположенный в аминокислотных остатках 41-61 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2); и внутриклеточный домен, расположенный в аминокислотных остатках 62-113 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2). Домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM) DAP12 расположен в аминокислотных остатках 80-118 DAP12 человека (SEQ ID NO: 2). Остаток аспарагиновой кислоты в DAP12 взаимодействует с трансмембранным доменом TREM2 человека, который содержит лизин в аминокислотном остатке 186, и трансдуцирует сигналы от TREM2, TREM1 и других родственных членов семейства IgV.

Могут быть получены агонистические антитела к DAP12, которые нацелены на аминокислотные остатки 22-40 DAP12 человека. Считается, что DAP12 представляет собой связанный дисульфидной связью димер, связанный с TREM2, и что димеризация DAP12 с антителом к внеклеточному домену, охва-

тывающего аминокислотные остатки 22-40, активирует одну или более активностей TREM2 и/или DAP12.

Обсуждаемые в данном документе исследования описывают образование агонистических антител, которые связывают TREM2. Антитела подвергают скринингу на связывание с клетками, экспрессирующими TREM2, и их способность активировать передачу сигналов TREM2, и функциональность.

Результаты.

Продуцирование антитела к TREM2.

Антитела, которые связывают внеклеточный домен TREM2, в частности домен IgV (аминокислотные остатки 29-112 из SEQ ID NO: 1) были получены с использованием следующей процедуры. Как было описано ранее, были сконструированы, сгенерированы и размножены восемь наивных синтетических дрожжевых библиотек каждая по $\sim 10^9$ клеток (см, например, WO 2009036379; WO 2010105256; WO 2012009568; Xu et al., (2013) Protein. Eng. Des. Sel. 26 (10):663-670). Платформа для обнаружения антител на основе дрожжей ADIMAB, использованная в данном документе, позволила идентифицировать полностью человеческие полноразмерные моноклональные антитела IgG1 с широким эпителическим покрытием. Дрожжи ADIMAB разработаны для транспортировки высококачественных, полных IgG через секреторный путь, и затем для представления их на поверхности или выделения непосредственно в среду.

Для первых раундов отбора использовался метод сортировки магнитных шариков на основе системы Miltenyi MACS, как было описано ранее (Siegel et al., (2004) J. Immunol. Methods 286(1-2):141-53). Вкратце, клетки дрожжей ($\sim 10^{10}$ клеток/библиотеку) инкубировали с 3 мл 200 нМ биотинилированного антигена TREM2 или 10 нМ биотинилированного TREM2-Fc слитого антигена в течение 15 мин при комнатной температуре в FACS промывочном буфере ФСБ с 0,1% БСА. Биотинилирование проводили с использованием комплекта для биотинилирования EZ-Link Sulfo-NHS (Thermo Scientific, Cat #21425). После однократного промывания с помощью 50 мл охлажденного льдом промывочного буфера конгломерат клеток ресуспендировали в 40 мл промывочного буфера и 500 мкл микросфер со стрептавидином (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. Cat # 130-048-101) добавляли к дрожжам и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера и загружали в колонку MACS LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. Cat.# 130-042-401). После загрузки 5 мл колонку промывали 3 раза с помощью 3 мл промывочного буфера FACS. Затем колонку удаляли из магнитного поля, и дрожжи элюировали 5 мл среды для роста и затем выращивали в течение ночи. Следующие три раунда сортировки были выполнены с использованием проточной цитометрии. Приблизительно 1×10^8 клеток дрожжей были осажжены, промыты три раза промывочным буфером и инкубированы соответственно 200, 100 или 10 нМ биотинилированным TREM2 в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем дрожжи дважды промывали и окрашивали с помощью козьего антитела с FITC к F(ab')₂ каппа человека, разбавленным 1:100 (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, Cat # 2062-02) и либо стрептавидином-Alexa Fluor 633 (Life Technologies, Grand Island, NY, Cat # S21375), разбавленным 1:500, либо экстравидин-фикоэритрином (Sigma-Aldrich, St Louis, Cat # E4011), разбавленным 1:50 вторичными реагентами в течение 15 мин при 4°C. После двукратного промывания ледяным буфером для промывки конгломераты клеток ресуспендировали в 0,4 мл промывочного буфера и переносили в пробирки для сортировки с фильтром. Сортировка проводилась с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences), и для сортировки были выбраны только клоны для связывания TREM2 в течение двух раундов, и третий раунд представлял собой отрицательную сортировку для уменьшения связывания реагентов. После заключительного раунда сортировки дрожжи высевали в чашки и отдельные колонии собирали для характеристики.

Дрожжевые клоны выращивали до насыщения и затем индуцировали в течение 48 ч при 30°C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой с pH 2,0. Фрагменты Fab генерировали с помощью расщепления папаином и очищали с помощью KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences, Cat # 17-5458-01). Для дальнейшего анализа были отобраны два антитела (At21 и At52).

Последовательности переменного домена тяжелой цепи и легкой цепи антител At21 и At52.

Используя стандартные методы, были определены аминокислотные последовательности, кодирующие тяжелую цепь (фиг. 2B) и легкую цепь (фиг. 2C) переменного домена антитела At21 и антитела At52.

Последовательности CDR антитела At21 и антитела At52 по Kabat приведены в табл. 1.

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела At21 представляет собой

```
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWVGIYPGSDSTRYSPSF
QQQVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARAGHYDGGHLGMDVWGQGT TTVTVSS (SEQ
ID NO: 410),
```

и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела 21 представляет собой

EIVMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFS

GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDDSAFYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:411).

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела Ат52 представляет собой

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFYTSYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKF

QGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREADDSSGYPLGLDVGQGMVTVSS (SEQ

ID NO:412)

и аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 52 представляет собой

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG

SQSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQVNSLPPTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:413).

Таблица 1А. Последовательности CDR тяжелой цепи по Kabat

| Название антитела | CDR H1 | CDR H2 | CDR H3 |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Ат21 | YSFTTYWIG (SEQ ID NO:404) | IIYPGSDTRYSPSFQG (SEQ ID NO:405) | ARAGHYDGGHLMGDV (SEQ ID NO:406) |
| Ат52 | YTFTSYIHWVRQ (SEQ ID NO:398) | IINPSGGSTSYAQKFG (SEQ ID NO:399) | AREADDSSGYPLGLDV (SEQ ID NO:400) |

Таблица 1В. Последовательности CDR легкой цепи по Kabat

| Название антитела | CDR L1 | CDR L2 | CDR L3 |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Ат21 | RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:407) | GASNRAT (SEQ ID NO:408) | QQDDSAFYT (SEQ ID NO:409) |
| Ат52 | RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:401) | GASTRAT (SEQ ID NO:402) | QQVNSLPPT (SEQ ID NO:403) |

Характеристика связывания Ат21 и Ат52.

Исходная характеристика антител TREM2 включала определение их способности связывать TREM2, экспрессируемых на дендритных и других первичных иммунных клетках человека или мыши. Клетки собирали, помещали в концентрации 10^5 /мл в 96-луночный планшет, промывали и инкубировали в 100 мкл ФСБ, содержащем 10-50 мкг/мл мАт и реагента, блокирующего Fc в течение 1 ч на льду. Затем клетки дважды промывали и инкубировали в 100 мкл ФСБ, содержащем 5 мкг/мл вторично антитела, конъюгированного с PE в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали в холодном ФСБ и оценивали количественно с помощью BD FACS Canto. Анализ данных и расчет значений MFI выполнялся с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7.

Антитела Ат21, Ат52, Ат16, Ат20, Ат66 и Ат68 демонстрировали связывание с клеточной линией мыши (BWZ T2), экспрессирующей рекомбинантную TREM2 мыши, как показано с помощью позитивного окрашивания антител TREM2, обнаруженным с помощью анализа FACS (гистограммы с черным контуром) (фиг. 3А). Антитела Ат21 и Ат52 демонстрировали связывание антител с макрофагами ДТ (TREM +/+), полученными из костного мозга мыши (BMMac, mMac), но не с TREM2-дефицитными (TREM2 -/-) макрофагами мыши (BMMac, mMac) (фиг. 3В). Антитела Ат21 и Ат52 демонстрируют связывание как с линией клеток человека (293), экспрессирующей рекомбинантный TREM2 человека (фиг. 4А), так и с первичными дендритными клетками человека (чДК) (фиг. 4В). В противоположность этому, антитела Ат43 и Ат60 связываются с линией клеток человека, экспрессирующей рекомбинантный TREM2 человека (фиг. 4А), но не связывался с первичными дендритными клетками человека (фиг. 4В).

Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для типов клеток, связанных антителами Ат21 и Ат21 к TREM2, приведены в табл. 4. Связывание сравнивают с родительской клеточной линией мыши (mTREM2 родительская клеточная линия BWZ), первичной клеточной линией человека (чTREM2 родительская клеточная линия (293)), первичными TREM2-дефицитными макрофагами мыши (mMac KO MFI) и первичными TREM2-дефицитными дендритными клетками мыши (мДК KO MFI).

Таблица 4. Связывание антитела к TREM2 с клетками человека и мыши

| Антител о | мTREM2 Клеточная линия (BWZ- родительс кая) MFI | мTREM2 Клеточна я линия (BWZ T2) MFI | чTREM2 родител ьская клеточн ая линия (293) MFI | чTREM2 клеточн ая линия (293) MFI | мМак КО MFI | мМак ДТ MFI | мДК КО MFI | мДК ДТ MFI | чДК % ПОЗИТИ ВНЫХ |
|--------------|--|--|--|--|----------------|----------------|---------------|---------------|-------------------------|
| Ат52 | 1021 | 15613 | 89 | 1411 | 73,3 | 174,0 | 203 | 663 | 69,1 |
| Ат21 | 1036 | 13840 | 81 | 1884 | 64,7 | 111,0 | 187 | 464 | 77,1 |

Аффинность связывания каждого антитела к TREM2 определяли путем измерения их K_D с помощью ForteBio или MSD-SET. Измерения аффинности с помощью ForteBio проводили, как описано ранее (Estep et al., (2013) MAbs 5(2):270-8). Вкратце, измерения аффинности с помощью ForteBio проводили путем загрузки IgG в режиме онлайн на датчики ANQ. Датчики уравнивали в режиме оффлайн в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления базовой линии. Датчики с загруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 5 мин, затем переносили в буфер для анализа в течение 5 мин для измерения скорости реакции. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1.

Измерения равновесной аффинности проводили, как описано ранее (Estep et al., (2013) MAbs 5(2):270-8). Титрования до конечной точки (SET) проводили в ФСБ+0,1% БСА без IgG (PBSF) при постоянной концентрации антигена 50 пМ и инкубировали с 3-5-кратным серийным разведением антитела, начиная с 10 нМ. Антитела (20 нМ в ФСБ) наносили на стандартные связующие MSD-ECL планшеты в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты блокировали в течение 30 мин при встряхивании со скоростью 700 об/мин, после чего проводили три промывки промывочным буфером (PBSF+0,05% Tween 20). Образцы SET наносили и инкубировали на планшетах в течение 150 с при встряхивании со скоростью 700 об/мин с последующей однократной промывкой. Антиген, захваченный на планшете, обнаруживали с помощью 250 нг/мл сульфотаг-меченного стрептавидина в PBSF путем инкубации на планшете в течение 3 мин. Планшеты трижды промывали промывочным буфером и затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400 с использованием однократного буфера Read Buffer T с поверхностно-активным веществом. Процент свободного антигена наносили на график как функцию титруемого антитела в Prism и подводили к квадратному уравнению для получения значения K_D . Для повышения производительности использовались роботы для манипуляций в жидкости во всех экспериментах MSD-SET, включая подготовку образцов SET.

В табл. 5 перечислены значения, отражающие аффинность связывания (K_D) антител Ат21 и Ат52 к слитому белку TREM2 Fc человека (чTREM2-Fc), мономерный меченный His белок TREM2 человека (чTREM2-HIS) и слитый белок TREM2 Fc мыши (мTREM2-Fc).

Таблица 5. Аффинность связывания антител к TREM2

| Антител о | IgG K_D чTREM2-Fc (М) Авид | Моновалентный IgG K_D чTREM2-HIS (М) | IgG K_D мTREM2-Fc (М) Авид |
|--------------|---------------------------------|---|---------------------------------|
| Ат52 | 1,51E-09 | 5,75E-09 | 8,96E-11 |
| Ат21 | 3,44E-10 | 1,14E-09 | 2,27E-10 |

Пример 2. Нормализация и снижение ответов Toll-подобного рецептора (TLR) в дендритных клетках с помощью агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12.

Дендритные клетки костного мозга (BMDC), стимулируют путем культивирования с лигандами TLR, такими как ЛПС, CpG ДНК и зимозан в течение 16 ч. Кондиционированную среду собирают и проводят анализы ИФА для оценки секреции цитокинов ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70 и ФНО. Считается, что клетки BMDC, которые не имеют активного TREM2, могут секретировать значительно больше ИЛ-12, p70 и ФНО, чем клетки BMDC, которые имеют активированный TREM2 после стимуляции. Кроме того, полагают, что агонистические антитела к TREM2 снижают уровни экспрессии ИЛ-12, p70 и ФНО. Дендритные клетки костного мозга мышей дикого типа и из гетерозиготных по TREM2 мышей, которые имеют частично неактивный TREM2, будут служить в качестве положительных контролей для определения уровней экспрессии цитокинов ИЛ-12, p70 и ФНО, а также их модуляции с помощью агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител TREM2/DAP12.

Концентрацию цитокинов в надосадочных средах определяют с использованием комплектов для ИФА мышинных ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70, ФНО и ИЛ-10 (eBioscience) и комплекта для ИФА VeriKine Mouse IFN- β (источник интерферона PBL) в соответствии с протоколом производителя. Уровни мРНК для этих цитокинов также измеряют с помощью количественной ОТ-ПЦР (кОТ-ПЦР). Суммарную РНК получают с использованием комплекта RNeasy plus mini kit (QIAGEN), обратно транскрибируют с помощью обратной транскриптазы Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) с использованием олиго-dT-праймера в соответствии с протоколом производителя. Количественная ПЦР проводят с использованием Master SYRR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и 7900HT (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя. Последовательности праймеров к ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70 и ФНО представлены согласно описанию (например, Hamerman, JA, Eur. J. Immunol. 2012. 42: 176-185).

Пример 3. Нормализация и снижение способности BMDC индуцировать антигенспецифическую пролиферацию Т-клеток агонистическими антителами к TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами к TEM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут снижать и нормализовать способность дендритных клеток, полученных из костного мозга (BMDC), индуцировать антигенспецифическую пролиферацию Т-клеток.

Овальбумин (OVA)-специфический Т-клеточный ответ, индуцируемый BMDC, может быть определен с помощью разведения CFSE. BMDC выделяют с помощью MACS после 6 дней культивирования и высевают 1×10^4 клеток на лунку 96-луночного планшета с круглым дном с OVA (2 или 0,5 мг/мл) и CpG ДНК (100 или 25 нМ) в присутствии ГМ-КСФ (10 нг/мл) в течение 4 ч. CD4 Т-клетки из селезенки и лимфатических узлов трансгенных мышей ОТ-II выделяют с использованием комплекта Dynal Mouse CD4 Negative Isolation Kit (Invitrogen) и окрашивают с помощью CFSE (конечная концентрация 0,8 мМ). Через 4 ч культивирования ДК в каждую лунку добавляют 1×10^5 CFSE-меченых CD4 ОТ-II Т-клеток и инкубировали в течение 72 ч. После культивирования клетки окрашивают с помощью моноклонального антитела к CD4 и проводят проточную цитометрию для определения разведения CFSE в закрытых CD4 ОТ-II Т-клетках. Анализ данных для расчета процента индекса разделения и индекса деления выполняется с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) (Eur. J. Immunol. 2012. 42: 176-185).

Пример 4. Нормализация и снижение ответов Toll-подобного рецептора (TLR) в макрофагах с помощью агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12.

При отсутствии TREM2 изменяются ответы от макрофагов, полученных из костного мозга, (BMDC) или от первичных перитонеальных макрофагов при передаче сигналов TLR (Turnbull, I.R. et al., J. Immunol. 2006; 177:3520-3524). Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут снижать и нормализовать ответы TLR в макрофагах.

Для выявления первичных макрофагов мышей обрабатывают 1,5 мл 2% тиогликолятной средой путем внутрибрюшинной инъекции и затем клетки выделяют путем перитонеального смыва. Для получения BMDC общий костный мозг культивируют в DMEM, обогащенной 10% телячьей сывороткой, 5% лошадиной сывороткой и 6 нг/мл рекомбинантным КСФ-1 человека (R&D Systems). Клетки культивируют в течение 5-6 дней и адгезивные клетки отделяют с помощью 1 М ЭДТА в ФСБ. Клетки окрашивают с помощью коммерчески доступных антител: антитела к CD11b, антитела к CD40, антитела к GR1 (BD Pharmingen) и F4/80 (Caltag Laboratories).

BMDC повторно высевают и оставляют прилипать в течение 4 ч при 37°C, и затем добавляют агонисты TLR, такие как ЛПС (*Salmonella abortus equi*), зимозан (*Saccharomyces cerevisiae*) и CpG 1826 ДНК (приобретено у, например, Sigma-Aldrich). Супернатант клеточной культуры собирают через 24 ч после стимуляции, и уровни ИФН- α 4, ИФН- β , ИЛ-6, ИЛ-12 p70 и ФНО цитокинов измеряют с помощью ИФА или цитометрической матрицы (комплект для измерения воспаления у мышей BD Biosciences).

Пример 5. Индукция противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в клетках-предшественниках миелоидного происхождения, полученных из костного мозга, с помощью агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12.

Считается, что клетки-предшественники миелоидного происхождения, полученные из костного мозга, могут проявлять увеличение противовоспалительного цитокина ИЛ-10 после лечения агонистическими антителами к TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами TREM2/DAP12 и стимуляции с помощью 100 нг/мл ЛПС (Sigma), путем совместного культивирования с апоптотическими клетками или с помощью аналогичного стимула.

Выделение клеток-предшественников миелоидного происхождения, полученных из костного мозга, выполняют следующим образом. Клетки костного мозга выделяют из взрослых 6-8-недельных самок мышей C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Germany) из медуллярных полостей большеберцовой кости и бедра задних конечностей. Удаление эритроцитов осуществляется путем лизиса с помощью гипотонического раствора. Клетки культивируют в среде DMEM (Invitrogen), содержащей 10% фетальную сыворотку теленка (Pan Biotech) и 10 нг/мл ГМ-КСФ (R&D Systems) в 75 см² колбах для культуры (Greiner Bio-

One). Через 24 ч не прилипшие клетки собирают и повторно высевают в новой 75 см² колбах для культур. Среду меняют через 5 дней, а клетки культивируют в течение дополнительных 10-11 дней. Остальные клетки являются клетками-предшественниками миелоидного происхождения, полученными из костного мозга, и трансдуцированные вирусом TREM2. Затем трансдуцированные клетки исследуют на уровень ИЛ-10 в кондиционированных средах как в присутствии, так и в отсутствии агонистических антител к TREM2 и ЛПС. Супернатант собирают через 24 ч, и уровень ИЛ-10, высвобождаемый из клеток, определяют с помощью ИЛ-10 ИФА в соответствии с инструкциями производителя (QuantikineM mouse IL-10, R&D Systems) (JEM (2005), 201; 647-657; и PLoS Medicine (2004), 4 | Issue 4 | e124).

Пример 6. Индукция фагоцитоза апоптических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков в клетках миелоидной линии с помощью агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут индуцировать фагоцитоз одного или более апоптотических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел и болезнетворных белков, таких как А бета-пептид, белок альфа-синуклеин, белок Tau, белок TDP-43, белок приона, и белок Хантингтона в клетках миелоидной линии, таких как моноциты и микроглия.

Моноциты выделяют из периферической крови, которую собирают у взрослых мышей C57BL/6. Гипотонический лизисный буфер истощает эритроциты. Клетки высевают в культуральные чашки в среде RPMI (Invitrogen), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (Pan Biotech). Клетки культивируют в течение нескольких часов при 37°C в 10% CO₂. После обработки трипсином, прилипшие клетки собирают и используют для экспериментов с фагоцитозом.

Клетки микроглии получают из головного мозга мышей C57BL/6 на 3-5 день после рождения (P3-P5). Вкратце, мозговые оболочки удаляют механически, и клетки диссоциируют путем растирания и культивируют в минимальной среде (BME; GIBCO BRL), дополненной 10% ФТС (PAN Biotech GmbH), 1% глюкозой (Sigma-Aldrich), 1% L-глутамином (GIBCO BRL) и 1% пенициллин/стрептомицином (GIBCO BRL) в течение 14 дней для образования сливающегося глиального монослоя. Для сбора микрогенных клеток культуры встряхивают на роторном шейкере (200 об/мин) в течение 2 ч. Прикрепленные астроциты используются для иммуногистохимии. Отделенные клетки микроглии высевают в обычные чашки для культивирования в течение 1 ч, и затем все неприкрепленные клетки удаляют и не учитывают. Чистота выделенных микроглиальных клеток составляет около 95%, как определено с помощью проточной цитометрии с антителом к CD11b (BD Biosciences). Клетки микроглии культивируют в минимальной среде.

Олигодендроциты (т.е. нейроны) и клетки, обогащенные нейронами, получают из головного мозга эмбрионов мыши C57BL/6 (E15-16). Вкратце, ткань головного мозга выделяют и механически диспергируют, и высевают в чашки для культивирования, предварительно покрытые 0,01 мг/мл поли-L-орнитин (Sigma-Aldrich) и 10 мкг/мл ламинина (Sigma-Aldrich). Клетки культивируют в нейрональной кондиционированной среде (BME; GIBCO BRL) с добавлением 2% B-27 (GIBCO BRL), 1% глюкозы (Sigma-Aldrich) и 1% ФТС (PAN Biotech GmbH). Клетки культивируют в течение 5-10 дней для получения морфологически зрелых олигодендроцитов.

Для проведения фагоцитозных анализов апоптических нейронов, дебриса нервной ткани, дебриса не нервной ткани, бактерий, других инородных тел, болезнетворных белков микроглию трансдуцируют с помощью кшРНК TREM2, контрольной кшРНК, WTREM2, вектора контроля GFP1, mtDAP12-GFP и вектора контроля GFP2. После трансдукции микроглию культивируют в течение 72 ч для достижения эффективного нокдауна TREM2 посредством интерференции РНК. Нейроны культивируют в течение 5-10 дней, и затем в конечную концентрацию 30 нМ в течение 3 ч добавляют омегаиновую кислоту для индукции апоптоза. Нейронные клеточные мембраны метят мембранным красителем CellTracker CM-DiI (Molecular Probes). После инкубации апоптотические нейроны или другие мишени фагоцитоза дважды промывают и добавляют к трансдуцированной микроглиальной культуре в соотношении эффектор/мишень 1:20. Через 1 и 24 ч после добавления апоптотических нейронов количество микроглиата, имеющего фагоцитированные мембраны нейронов, подсчитывают под конфокальным флуоресцентным микроскопом (Leica). Апоптотические клетки подсчитывают в трех разных областях с увеличением 60. Количество фагоцитоза подтверждается проточной цитометрией. Кроме того, через 24, 48 или 72 ч после добавления апоптотических нейронов клетки собирают и используют для ОТ-ПЦР цитокинов.

Для проведения анализа гранул микросфер или анализа бактериального фагоцитоза микроглию трансдуцируют экспрессирующим вектором TREM2 или вектором контроля GFP. Затем клетки обрабатывают агонистическими антителами к TREM2. Через 24 ч 1,00 мкм красных флуоресцентных гранул микросфер (Fluoresbrite Polychromatic Red Microspheres; Polysciences Inc.) или флуоресцентных меченых бактерий добавляют в течение 1 ч. Фагоцитоз гранул микросфер или флуоресцентно меченых бактерий микроглией анализируют с помощью флуоресцентной микроскопии. Кроме того, микроглию собирают из культуральных планшетов и анализируют с помощью проточной цитометрии. Определяют процент микроглии, содержащей фагоцитированные гранулы. Поскольку фагоцитоз отличается от одного эксперимента к другому, также определяют относительное изменение фагоцитоза. Представлены данные как

относительное изменение фагоцитоза между микроглией, культивированной с агонистическими антителами, и контрольным антителом.

Для проведения ОТ-ПЦР для анализа транскриптов воспалительных генов микроглии трансдуцируется с помощью вектора TREM2 или вектора контроля GFP1. Затем клетки культивируют на чашках и обрабатывают агонистическими антителами к TREM2. Через 24, 48 и 72 ч РНК выделяют из микроглии с использованием комплекта RNeasy Mini Kit (QIAGEN). РНК также собирают из микроглии, которая была трансдуцирована с помощью кшРНК TREM2, контрольной кшРНК, WTREM2, вектора контроля GFP1, mtDAP12-GFP и вектора контроля GFP1, и совместно культивируют с апоптическими нейронами в течение 48 ч.

Затем выполняется обратная транскрипция РНК. Количественную ОТ-ПЦР с SYBR Green выполняют на ABI Prism 5700 Sequence Detection System (PerkinElmer). Амплификация GAPDH используют для нормализации образца. Протокол амплификации выполняется с помощью программного обеспечения GeneAmp 5700 Sequence Detection System (версия 1.3). Для обнаружения транскриптов GAPDH, ФНО-альфа, ИЛ-1, NOS2 и ТФР-бета, следующие прямые и обратные праймеры были использованы в конечных концентрациях 200 нМ:

GAPDH прямой праймер: 5'-CTCCACTCACGGCAAATTCAA-3' (SEQ ID NO: 416), и GAPDH обратный праймер: 5'-GATGACAAGCTTCCCATCTCTCG-3' (SEQ ID NO: 417);

ФНО- α обратный праймер: 5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATCT-3' (SEQ ID NO: 418), и ФНО- α обратный праймер: 5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGACTT-3' (SEQ ID NO: 419);

ИЛ-1 α обратный праймер: 5'-ACAA-CAAAAAGCCTCGTGCTG-3' (SEQ ID NO: 420) и ИЛ-1 α обратный праймер: 5'-CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA-3' (SEQ ID NO: 421);

NOS2 обратный праймер: 5'-GGCAAACCCAAGGTCTACGTTTC-3' (SEQ ID NO: 422), NOS2 обратный праймер: 5'-TACCTCATTTGGCCAGCTGCTT-3' (SEQ ID NO: 423); и

ТФР- β 1 обратный праймер: 5'-AGGACCTGGGTTGGAAGTGG-3' (SEQ ID NO: 424) и ТФР- β 1 обратный праймер: 5'-AGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3' (SEQ ID NO: 425).

Для проведения анализа фагоцитоза амилоида 20 нМ HiLyteFluor™ 647 (Anaspec)-Abeta-(1-40) ресуспендировали в трис/ЭДТА (рН 8,2) и затем инкубировали в темноте в течение 3 дней при 37°C для содействия кластеризации. Клетки микроглии предварительно обрабатывают в низкой сыворотке (0,5% ФСБ, дополненный инсулином), ЛПС (50 нг/мл), ИФНс (100 единиц/мл) и агонистическим антителом к TREM2 в течение 24 ч до добавления агрегированного флуоресцентно-меченого бета-пептида. Амилоидный фагоцитоз и поверхностную экспрессию TREM2 определяют с помощью проточного цитометрического анализа через 5 ч после добавления 100 нМ агрегированного HiLyteFluor™ 647-Ab-(1-40) (ASN NEURO (2010) 2(3): 157-170). Фагоцитоз других болезнетворных белков проводится аналогичным образом.

Пример 7. Индукция активации ERK агонистическими антителами TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами TREM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут индуцировать активацию ERK.

Микроглию трансдуцируют вектором TREM2, и 2×10^5 клеток подвергаются воздействию агонистическими антителами к TREM2, агонистическими антителами к DAP12 и/или биспецифическими антителами к TREM2/DAP12 в течение 1 ч. После стимуляции клетки лизируют в разводящем буфере для вестерн-блоттинга. Фосфорилирование ERK и общее количество ERK определяют с помощью иммунодетектирования антител к фосфо-ERK и антител к ERK соответственно (и то и другое от Cell Signaling Technology) с помощью вестерн-блоттинга (JEM (2005), 201, 647-657).

Пример 8. Индукция CCR7, и миграция в отношении CCL19 и CCL21 в микроглии, макрофагах и дендритных клетках агонистическими антителами TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами TREM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут индуцировать CCR7 и миграцию в отношении CCL19 и CCL21 в клетках микроглии, макрофагах и дендритных клетках.

Клетки микроглии трансдуцируют вектором TREM2 или вектором контроля GFP1. Трансдуцированные клетки микроглии затем либо культивируются с использованием агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12, либо с контрольным антителом. Клетки собирают через 72 ч, метят специфическими антителами к CCR7 и анализируют с помощью проточной цитометрии.

Для определения каких-либо функциональных последствий повышенной экспрессии CCR7 проводят анализ хемотаксиса. Клетки микроглии стимулируют посредством TREM2 с использованием агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 и помещают в двухкамерную систему. Количественно определяют клетки микроглии, мигрирующие к хемокиновым лигандам CCL19 и CCL21, (JEM (2005), 201, 647-657).

Для анализа хемотаксиса клетки микроглии подвергаются воздействию агонистическими антителами

ми к TREM2, агонистическими антителами к DAP12 и/или биспецифическими антителами к TREM2/DAP12 и обрабатываются 1 мкг/мл ЛПС. Микроглию переносят в верхнюю камеру системы Трансвелл (фильтр с порами 3 мкм; Millipore), содержащий 450 мкл среды с 100 нг/мл CCL19 или CCL21 (и тот и другой от RgeroTech) в нижней камере. После 1 ч инкубационного периода количество клеток микроглии, которые мигрировали в нижнюю камеру, подсчитывают в трех независимых областях с помощью микроскопии (JEM (2005), 201, 647-657).

Пример 9. Индукция F-актина в микроглии, макрофагах и дендритных клетках агонистическими антителами TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами TREM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут индуцировать F-актин в клетках микроглии, макрофагах и дендритных клетках.

Микроглию и другие представляющие интерес клетки, которые трансдуцированы TREM2 или экспрессируют TREM2, добавляют в культуральные планшеты, и затем подвергают воздействию подвергаются воздействию агонистическими антителами к TREM2, агонистическими антителами к DAP12 и/или биспецифическими антителами к TREM2/DAP12 в течение 1 ч. Клетки фиксируют, блокируют и затем окрашивают с помощью Alexa Fluor 546-конъюгированного фаллоидина (Molecular Probes) через 1 ч, и F-актин метят флуоресцентным красителем. Изображения собирают с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с 40-кратным объективом (Leica). (JEM (2005), 201, 647-657).

Пример 10. Индукция продуцирования остеокластов и увеличение скорости остеокластогенеза агонистическими антителами TREM2, DAP12 и/или биспецифическими антителами TREM2/DAP12.

Считается, что агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 могут индуцировать продуцирование остеокластов и увеличение скорости остеокластогенеза.

Клетки RAW264.7, которые образуют остеокласты или клетки-предшественники моноцитов/макрофагов костного мозга (BMM), содержатся в среде RPMI-1640 (Mediatech) или в другой подходящей среде, дополненной 10% ФСБ (Atlantic Biologics, Atlanta, GA, USA) и пенициллин-стрептомицин-глутамином (Mediatech). кДНК TREM2B с FLAG-эпитопом, добавленным к N-концу, вставляют в ретровирусный вектор рMXrie до IRES, за которым следует последовательность кДНК eGFP. Клетки трансфицируют с помощью рMXrie-FLAG TREM2B, используя Fugene 6 (Roche) в соответствии с протоколом производителя. Клетки отбирают в пурамицине (Sigma) при концентрации 2 мкг/мл. Стабильные устойчивые к пурамицину клоны скринируют на связывание моноклональных антител к FLAG M2 (Sigma) с использованием проточной цитометрии, и затем субклонировывают и поддерживают на пурамициновых средах для селекции.

Клетки RAW264.7, экспрессирующие TREM2B, высевают в 96-луночные планшеты по 3000 клеток/луночку в среде альфа-МЕМ, дополненной 10% ФСБ, пенициллин-стрептомицин-глутамином, 50 нг/мл RANKL и 20 нг/мл М-КСФ. Среду меняют каждые 3 дня, подвергают воздействию агонистическими антителами к TREM2, и количество многоядерных (по меньшей мере трехядерных) TRACP⁺ остеокластов подсчитывают с помощью световой микроскопии. Для определения сложности и размера остеокласты подсчитываются по числу ядер (> 10 или 3-10 ядер). Площадь поверхности остеокластов также измеряется с использованием программного обеспечения Image J (NIH). Кроме того, определяются уровни экспрессии генов остеокластов. Суммарную РНК экстрагируют из остеокластогенных культур в различные моменты времени с использованием реагента TRIzol (Invitrogen). После синтеза первой нити кДНК с использованием комплекта Superscript III (Invitrogen) проводят количественные реакции ПЦР в реальном времени для Nfatc1, Acp5, Ctsk, Calcr и Scnd1. Рассчитывают относительную количественную оценку экспрессии мРНК-мишени и нормируют на экспрессию циклофилина, и экспрессируют в виде (мРНК гена-мишени/мРНК циклофилина) 3×10^6 . (J. OF BONE AND MINERAL RESEARCH (2006), 21, 237-245; J Immunol 2012; 188:2612-2621).

Пример 11. Защита от ЕАЕ и купризна интактного животного *in vivo*.

Взрослым самкам мышей C57BL/6 в возрасте 7-9 недель (полученным от Charles River Laboratories) вводят в копчик с обеих сторон 200 мкл инноккулата, содержащего 100 мкг миелинового олигодендроцитарного гликопротеина пептида 35-55 (аминокислоты MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 415); Seqlab), и 1 мг Mycobacterium tuberculosis H37 Ra (Difco) в неполном адьюванте Фрейнда (Difco). Коклюшный токсин (200 нг, List Biological Laboratories) вводят в 0 день и на второй день после иммунизации. Клинические признаки оцениваются следующим образом: 0, отсутствие клинических признаков; 1, полностью поврежденный хвост; 2, полностью поврежденный хвост и ненормальная походка; 3, парализация одной задней конечности; 4, полный парализация задних конечностей; и 5, паралич или отмирание передних конечностей и задних конечностей.

Для экспериментов используются только мыши на начальной стадии заболевания (клинический показатель 1 или более) на 14-й день. Агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 вводят внутривенно или внутривенно мышам, страдающим ЕАЕ, в день первых клинических симптомов или в любое другое желаемое время (PLoS Med (2007) 4(4): e124).

Молодые или достигшие определенного возраста мыши дикого типа (Harlan) получают стандартную диету (Harlan), содержащую 0,2% купризона (CPZ) порошок бис оксалат (циклогексиденгидразид) (Sigma-Aldrich) в течение 4, 6 или 12 недель. Для гистологического и иммуногистохимического анализов головной мозг удаляют после перфузии мыши 4% параформальдегидом (ПФА), фиксирования в 4% ПФА в течение 24 ч с последующим погружением в 30% сахарозу в течение 24-48 ч. Для оценки целостности и повреждения миелина, а также клеточной пролиферации и секторов воспаления головной мозг мыши окрашивают с помощью антитела к MBP (1:100; Abcam, ab7349), антитела к dMBP (1:2000; Millipore, ab5864), антитела к APP (1:100, Invitrogen, 51-2700), антитела к SMI-31 (1:1000, Covance, smi-31R), антитела к Iba1 (1:600, Wako, 019-19741), антитела к BrdU (1:250, Abcam, Ab1893), антитела к GFAP (1:200, Invitrogen, 13-0300), антитела к iNOS (1:100, BD Pharmingen, 610329), антитела к LPL (1:400, от Dr. G. Olivecrona) и антитела к МНС II (1:100; BD Pharmingen, 553549). Для поведенческих эффектов антител мышей анализировали на локомоторную активность с использованием прозрачного ограждения из полистирола и компьютеризированного фотодатчика. Были проанализированы общие переменные активности (способность передвигаться, вертикальное выращивание), а также показатели эмоциональности, включая проведенное время, пройденное расстояние и приводимые данные. Ряд сенсомоторных тестов проводится для оценки баланса (планка и платформа), силы (решетка), координации (жердь и наклонные экраны) и инициации движения (инициация ходьбы). Координация движения и равновесие изучают с использованием протокола способа оценки способности удерживаться на вращающемся барабане (ротарод) (Cantoni et al., *Acta Neuropathol.* (2015) 129 (3): 429-47).

Пример 12. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 в достоверных моделях травматического повреждения головного мозга животных.

Терапевтическое применение агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 испытывается на достоверных моделях травматического повреждения головного мозга животных (Tanaka, Y. et al. (2013) *Neuroscience* 231 49-60).

Например, используется модель черепно-мозговой травмы, которая вызывает активацию микроглии и астроцитов. Используются самцы мыши C57BL/6J ДТ (8- или 9-недельные) или гетерозиготные по програнулину мыши (приобретенные у Charles River Laboratories или Jackson Laboratories). Мышей анестезируют путем внутрибрюшинного введения гидрохлорида ксилазина (8 мг/кг) и хлоралгидрата (300 мг/кг), растворенного в стерильном физиологическом растворе и затем помещают в стереотаксический аппарат (Narishige, Tokyo, Japan). Разрез производят по скальпу и оголяют череп. Надкостную плеву удаляют от черепа, просверливают отверстие над правым полушарием головного мозга с помощью бормашины и твердую мозговую оболочку удаляют кончиком иглы. Катетер из нержавеющей стали с наружным диаметром 0,5 мм используют для нанесения продольной колотой раны в правом полушарии. Канюлю располагают на 1,3 мм латерально от средней линии и на 1 мм сзади от брегмы, и вводят в мозг до тех пор, пока кончик не достигнет глубины 2 мм. Затем канюлю смещают на 2 мм каудально (брегма 3 мм) и затем сдвигают назад на 2 мм в исходное положение. Наконец, канюлю удаляют из мозга и рану скальпа зашивают. Затем мышей обрабатывают агонистическими антителами к TREM2, агонистическими антителами к DAP12 и/или биспецифическими антителами к TREM2/DAP12 в соответствии со стандартными процедурами и затем анализируют гистологически и с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, и поведенческих тестов.

Пример 13. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 в модели нейровоспаления и потери нейронов после травмы, вызванной токсинами.

Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 исследовалась на модели нейровоспаления и потери нейронов после травмы, вызванной токсинами (Tanaka, Y. et al. (Martens, L.H. et al., (2012) *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 3955).

Трехмесячным мышам вводят 4 внутрибрюшинные инъекции МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) в день в течение 2 дней (4 мкг/г массы тела) (Sigma-Aldrich) или ФСБ. Мышей обрабатывают агонистическими антителами к TREM2, агонистическими антителами к DAP12 и/или биспецифическими антителами к TREM2/DAP12 в соответствии со стандартным протоколом и затем анализируют с помощью стереологического подсчета для количественного определения дофаминовых нейронов и микроглии в компактной части черного вещества (SNpc), как описано.

Пример 14. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 на животных моделях старения, пароксизма, повреждении спинного мозга, дистрофии сетчатки, лобно-височной деменции и болезни Альцгеймера.

Терапевтическое применение агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 испытывается на животных моделях старения, пароксизма, повреждении спинного мозга, дистрофии сетчатки, лобно-височной деменции и болезни Альцгеймера, как описано ранее (например, Beattie, M.S. et al., (2002) *Neuron* 36, 375-386; Volosin, M. et al., (2006) *J. Neurosci.* 26, 7756-7766; Nykjaer, A. et al., (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49-57; Jansen, P. et al.,

(2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M. et al., (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fahnestock, M. et al., (2001) *Mol. Cell Neurosci.* 18, 210-220; Nakamura, K. et al., (2007) *Cell Death. Differ.* 14, 1552-1554; Yune, T. et al., (2007) *Brain Res.* 1183, 32-42; Wei, Y. et al., (2007) *Neurosci. Lett.* 429, 169-174; Provenzano, M.J. et al., (2008) *Laryngoscope* 118, 87-93; Nykjaer, A. et al., (2004) *Nature* 427, 843-848; Harrington, A.W. et al., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6226-6230; Teng, H.K. et al., (2005) *J. Neurosci.* 25, 5455-5463; Jansen, P. et al., (2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M. et al., (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fan, Y.J. et al., (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2380-2390; Al-Shawi, R. et al., (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2103-2114; и Yano, H. et al., (2009) *J. Neurosci.* 29, 14790-14802).

Пример 15. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 на моделях атеросклероза.

Терапевтическое применение агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 испытывается на моделях атеросклероза, как описано ранее (например, Lance, A. et al., (2011) *Diabetes*, 60, 2285; и Kjolby, M. et al., (2012) *Cell Metabolism* 12, 213-223).

Пример 16. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 на моделях инфекции.

Терапевтическое применение агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TEM2/DAP12 испытывается на моделях инфекции. Например, можно использовать *Listeria monocytogenes* или другую инфекцию у нормальных мышей или гетерозиготных по програнулину мышей, как описано ранее (например, Yin, F. et al., (2009) *J. Exp. Med.* 207, 117-128).

Пример 17. Характеристика терапевтического использования агонистических антител к TREM2, DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 на моделях воспалительного заболевания.

Терапевтическое применение агонистических антител к TREM2, агонистических антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 испытывается на моделях воспалительного заболевания. Например, ревматоидный артрит или достоверная модель другого воспалительного заболевания (Mizoguchi (2012) *Prog Mol. Biol. Transl Sci.*, 105:263-320; и Asquith et al., (2009) *Eur. J. Immunol.* 39:2040-4).

Пример 18. Скрининг антител к TREM2, антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12 которые индуцируют фосфорилирование DAP12, ERK и AKT, которые указывают на активацию пути ФИЗК.

Клетки (J774, RAW 264.7, клетки ВММ или остеокласты) удаляют из чашек для тканевых культур с ФСБ-ЭДТА, промывают ФСБ и подсчитывают. Клетки J774 (40×10^6) или RAW 264.7 (10×10^6 ВММ или остеокласты) инкубируют с антителом к TREM2, антителом к DAP12 и/или биспецифическим антителом к TREM2/DAP12 или с изотипически сходным контрольным антителом при 1 мкг/ 10^6 клеток в течение 20 мин на льду или в других условиях. Клетки лизируют в ледяном буфере для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA) [50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% Тритон-100, 1 мМ NaF, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 1 мМ 0,25% дезоксихолат натрия, апротинин (1 мкг/мл), лейпептин (1 мкг/мл), пепстатин (1 мкг/мл)] в течение 20 мин с последующим центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. Полученный супернатант подвергают реакциям иммунопреципитации с указанными антителами (DAP12, ERK или AKT) и белком А- или белком G-agarose (Sigma). микросферы интенсивно промывают буфером RIPA, и белки разделяют с помощью ДСН электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Затем белки переносят на нитроцеллюлозные мембраны методом вестерн-блоттинга, инкубируют с соответствующими антителами (антителами, которые специфически распознают фосфорилированную форму DAP12, ERK или AKT) и визуализируют с помощью усовершенствованной системы хемилюминесценции (ECL) (Pierce), как описано (например, Peng et al., (2010) *Sci Signal.*, 3(122): ra38).

Пример 19. Скрининг антител к TREM2, антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12, которые индуцируют поток кальция.

Клетки ВММ дважды промывают HEPES-содержащим буфером [20 мМ HEPES (рН 7.3), 120 мМ NaCl, 1 мМ CaCl, 1 мМ MgCl, 5 мМ KCl, глюкоза (1 мг/мл), бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл)] с последующей инкубацией в 0,05% Pluronic F-127 (Invitrogen) и 1 мкМ Indo-1 AM (Invitrogen) в течение 20 мин при 37°C. Клетки дважды промывают буфером HEPES и затем стимулируют антителом к TREM2, антителом к DAP12 и/или биспецифическим антителом к TREM2/DAP12 (16 мкг/мл), или контрольным антителом (16 мкг/мл), и измеряют с помощью спектрофотометра (PTL Photon Technology International). Индо-1 флуоресцентное излучение преобразуется в кальций (Ca^{2+}) в соответствии с инструкциями производителя (например, Peng et al., (2010) *Sci Signal.*, 3(122): ra38).

Пример 20. Скрининг антител к TREM2, антител к DAP12 и/или биспецифических антител к TREM2/DAP12, которые предотвращают апоптоз.

Зрелые клеточные культуры остеокластов дифференцируются в 24-луночных чашках с RANKL и М-КСФ. Через 4 дня полную среду заменяют бессывороточной средой для индукции апоптоза. Клетки, обработанные RANKL, ФСБ и антителом к TREM2, антителом к DAP12, и/или биспецифическим антителом к TREM2/DAP12, или изотипически сходным контрольным антителом во время ночного сывороточного голодания. Клетки фиксируют в 1% параформальдегиде и окрашивают комплектом TUNEL (Milli-

roge Corporation) в соответствии с инструкциями производителя. Апоптотические ядра подсчитывают с помощью микроскопа Nikon TE2000-E с 20-х увеличением. Результаты выражают как процент апоптотических клеток относительно общего количества клеток в шести случайно выбранных полях двух лунок, как описано (например, Peng et al., (2010) *Sci. Signal.*, 3(122): ra38). Аналогичные анализы проводят с первичными микроглиальными клетками.

Пример 21. Скрининг антител к TREM2, антител к DAP12 и/или биспецифических антител TREM2/DAP12, которые индуцируют дифференцировку остеокластов.

Клетки BMM высевали на планшеты в лунках в трех повторах и обрабатывают RANKL, M-KCF и антителом к TREM2, антителом к DAP12 и/или биспецифическим антителом TREM2/DAP12 или изотипически сходным контрольным антителом. Среду меняют каждые 3 дня до появления больших многоядерных клеток. Через 3-5 дней культивирования клетки фиксируют с помощью 3,7% формальдегида в ФСБ в течение 10 мин. Затем планшеты дважды промывают в ФСБ, инкубируют в течение 30 с в растворе 50% ацетона и 50% этанола и промывают с помощью ФСБ. Клетки окрашивают устойчивой к тартрату кислотой фосфатазой (TRAP) с помощью комплекта от Sigma (продукт 435). Многоядерные (более двух ядер) TRAP-позитивные клетки затем подсчитывают с помощью световой микроскопии, как описано (например, Peng et al., (2010) *Sci Signal.*, 3(122): ra38).

Пример 22. Скрининг антител к TREM2, антител к DAP12 и/или биспецифических антител TREM2/DAP12, которые нормализуют TREM2/TYROBP-зависимые изменения экспрессии генов в иммунном/микроглии регуляторном модуле.

Клетки микроглии, полученные из эмбриональных стволовых клеток мыши, являются генетически модифицированы лентивирусными векторами для сверхэкспрессии либо полноразмерной, либо усеченной версии Tyrobp, в которой отсутствуют оба внутриклеточных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотива (ITAM). Клетки микроглии также получают из эмбриональных стволовых клеток мыши, которые являются гетерозиготными по TREM2. Для оценки изменений полногеномной генной экспрессии в ответ на перетрубации Tyrobp или TREM2 данные генной экспрессии получают с помощью РНК секвенирования клеточных линий микроглии мыши, сверхэкспрессирующих: (1) носитель, (2) полноразмерный Tyrobp или (3) доминантно-негативно усеченный Tyrobp; или (4) сверхэкспрессирующий нокаутирующую конструкцию для TREM2, такую как киРНК и клетки, которые являются гетерозиготными по TREM2. Было идентифицировано приблизительно 2638 и 3415 дифференциально экспрессируемых генов для сверхэкспрессии полноразмерных Tyrobp и усеченных Tyrobp соответственно (Zhang et al., (2013) *Cell* 153, 707-720). Примерно 99% дифференциально экспрессируемых генов микроглии, сверхэкспрессирующие интактный Tyrobp, являются понижающе регулирующимися по сравнению с контрольным носителем. Например, 658 генов, связанных с вакуолей/аутофагией, а также генов, вовлеченных в метаболизм РНК и митоз клеточного цикла, подавляются активным Tyrobp, но активируются в клетках, экспрессирующих доминантно-негативно усеченный Tyrobp. И, наоборот, около 2865 генов для вакуолей/аутофагии и для митохондрии избирательно активируются в микроглии, экспрессирующей доминантно-негативно усеченный Tyrobp.

Агонистические антитела к TREM2, агонистические антитела к DAP12 и/или биспецифические антитела к TREM2/DAP12 подвергают скринингу на их способности вызывать профили генной экспрессии, близкие к наблюдаемым в нормальных клетках микроглии и в клетках микроглии, сверхэкспрессирующих интактный Tyrobp, в клетках, которые экспрессируют доминантно-негативно усеченный Tyrobp (Zhang et al., (2013) *Cell* 153, 707-720), в клетках, которые экспрессируют нокаутирующую конструкцию для TREM2, или в клетках, которые являются гетерозиготными по TREM2. Отбираются антитела, которые способны изменять сеть генной экспрессии.

Пример 23. Антитела к TREM2 индуцируют экспрессию CD83 и CD86 на дендритных клетках человека (ДК).

Для оценки способности антител к TREM2 модифицировать экспрессию CD83 и CD86 как связанные на планшете, так и растворимые антитела инкубировали с дендритными клетками (ДК) и измеряли экспрессию CD83 и CD86.

Антитела высевали в течение ночи при 4°C в 12-луночных планшетах при концентрации 2 или 5 мкг/мл в ФСБ. На следующий день лунки промывали 3 раза с помощью ФСБ. На 5 день незрелые ДК человека собирали и высевали в количестве 1 миллион клеток на лунку, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в отсутствие цитокина. Анализ FACS CD86, CD83, CD11c, HLA-DR и LIN (BD Biosciences) был выполнен на BD FACS Canto через 48 ч. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7. Уровни CD83 и CD86 оценивали на популяциях CD11c+HLA-DR+LIN-клеток.

В альтернативном варианте 5-дневные незрелые дендритные клетки человека высевали в количестве 100000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном, не обработанный ТС, в среду без цитокина. Антитела добавляли в концентрации 5 мкг/мл с или без удаленного вторичного антитела человека к ЛПС (Jackson ImmunoResearch) в концентрации 20 мкг/мл. Анализ FACS CD86, CD83, CD11c, HLA-DR и LIN (BD Biosciences) выполняли через 48 ч после добавления антител, как описано выше.

Связанные на планшете антитела At21 и At52 к TREM2 увеличивали частоту CD83+CD86+ДК по

сравнению с антителом контрольного изотипа Ат88 (фиг. 5А). Растворимые антитела Ат21 и Ат52, как сами по себе, так и перекрестно-сшитые с античеловеческим вторичным антителом, индуцировали эквивалентную экспрессию CD86 на ДК по сравнению с антителом контрольного изотипа (Ат88) (фиг. 5В). Основываясь на этих результатах, антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 функционируют как агонисты, чтобы индуцировать экспрессию воспалительных поверхностных маркеров CD83 и CD86 на дендритных клетках человека.

Пример 24. Антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 индуцируют фосфорилирование Syk.

Тирозинкиназа селезенки (Syk) является внутриклеточной сигнальной молекулой, которая функционирует после TREM2 в метаболическом пути путем фосфорилирования нескольких субстратов, таким образом, способствуя формированию сигнального комплекса, который приводит к клеточной активации и воспалительным процессам. Способность агонистических антител к TREM2 индуцировать активацию Syk определяли путем культивирования макрофагов человека и мыши и первичных дендритных клеток человека и измерения состояния фосфорилирования белка Syk в клеточных экстрактах.

Макрофаги из костного мозга (BMDM), BMDM мыши ДТ, BMDM мыши с нокаутным (KO) TREM2 и первичные дендритные клетки человека помещали на обедненную среду в течение 4 ч, содержащую 1% сыворотку RPMI, и затем удаляли из чашек для тканевых культур с помощью ФСБ-ЭДТА, промывали ФСБ и подсчитывали. Клетки покрывали полноразмерными агонистическими антителами Ат21 и Ат52 к TREM2 или контрольными антителами (Ат89 или Ат92) в течение 15 мин на льду. После промывания холодным ФСБ клетки инкубировали при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. После стимуляции клетки лизировали буфером для лизиса (1% об/об NP-40%, 50 мл Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl₂, 10% глицерин, плюс ингибиторы протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. Затем лизаты иммунопреципитировали с помощью антитела к Syk (N-19 для BMDM или 4D10 для ДК человека, Santa Cruz Biotechnology). Осажденные белки фракционировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, переносили на ПВДФ-мембраны и зондировали с помощью антитела к фосфотирозину (4G10, Millipore). Для подтверждения того, что все субстраты были адекватно иммунопреципитированы, иммуноблоты были повторно зондированы с помощью антитела к Syk (Abcam, для BMDM) или антитела к Syk (Novus Biological, для ДК человека). Визуализацию проводили с помощью усовершенствованной системы хемилюминесценции (ECL) (GE Healthcare), как описано (например, Peng et al., (2010) *Sci Signal.*, 3(122): ra38).

Антитела Ат21 и Ат51 к TREM2 индуцировали фосфорилирование Syk в клетках TREM2 BMDM мыши ДТ, но не индуцировали фосфорилирование в клетках TREM2 KO (TREM2^{-/-}) cells (фиг. 6А). Антитела Ат21 и Ат51 также индуцировали фосфорилирование Syk как в BMDM человека (фиг. 6А, правая панель), так и в первичных дендритных клетках человека (фиг. 6В). Контрольные антитела Ат89 и Ат92 не индуцировали фосфорилирование Syk. Основываясь на этих результатах, антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 функционируют как агонисты, чтобы индуцировать фосфорилирование Syk в макрофагах и дендритных клетках.

Пример 25. Антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 индуцируют фосфорилирование DAP12 в макрофагах мыши.

TREM2 передает сигнал посредством DAP12, что приводит к нисходящей активации ФИЗК и других внутриклеточных сигналов. Способность агонистических антител к TREM2 индуцировать активацию DAP12 определяли путем культивирования макрофагов мыши и измерения состояния фосфорилирования белка DAP12 в клеточных экстрактах.

Перед стимуляцией антителами макрофаги мыши (ДТ) из костного мозга (BMDM) и BMDM мыши с нокаутным (KO) TREM2 помещали на обедненную среду в течение 4 ч, содержащую 1% сыворотку RPMI. 15×10⁶ клеток инкубировали на льду в течение 15 мин с полноразмерными агонистическими или контрольными антителами. Клетки промывали и инкубировали при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. После стимуляции клетки лизировали буфером для лизиса (1% об/об NP-40%, 50 мл Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl₂, 10% глицерин, плюс ингибиторы протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16,000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. Клеточный лизат иммунопреципитировали вторым антителом TREM2 (R&D Systems). Осажденные белки фракционировали с помощью электрофореза ДСН-ПААГ, переносили на ПВДФ-мембраны и зондировали с помощью антитела к фосфотирозину (4G10, Millipore). Мембрану отделяли и повторно зондировали с помощью антитела к DAP12 (Cells Signaling, D7G1X). Каждый клеточный лизат, использованный для иммунопреципитации TREM2, содержал равное количество белков, как было показано с помощью контрольного антитела (антитела к актину, Santa Cruz).

DAP12 осаждается совместно с TREM2 и фосфорилируется в макрофагах ДТ, инкубированных с агонистическими антителами Ат52 к TREM2 (фиг. 7А) и Ат21 (фиг. 7В). И наоборот, фосфорилирование DAP12 не наблюдалось в макрофагах с TREM2 KO (TREM2^{-/-}), инкубированных с Ат21 (фиг. 7В). Эти результаты демонстрируют, что DAP12 связан с белком TREM2, и что агонистические антитела TREM2 способны индуцировать фосфорилирование DAP12 in vitro.

Пример 26. Антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 конкурируют с лигандом TREM2 для связывания с TREM2 человека и мыши.

Способность агонистических антител TREM2 распознавать сайт связывания лиганда с TREM2 оценивали с помощью анализа конкурентного связывания с использованием клеток *E.coli*, экспрессирующих предполагаемый лиганд TREM2.

E.coli выращивали в 10 мл среды LB O/N, собирали с помощью центрифугирования и дважды промывали в 10 мл ФСБ. *E.coli* затем подвергали термической инактивации путем инкубации в водяной бане при температуре 70°C в течение 30 мин. *E.coli* метили с помощью CellTracker DeepRed (ThermoFisher/Invitrogen, конечная концентрация 1 мкМ) и затем трижды промывали в 10 мл ФСБ, и ресуспендировали в 1 мл ФСБ в концентрации 10⁸/мл. Для конкурентного связывания бактерии добавляли к TREM2 мыши и к клеточной линии (BWZ), экспрессирующей DAP12, или к клеточной линии BW, экспрессирующей слитый белок TREM2/DAP12 человека, вместе с 10 мкг/мл полноразмерных агонистических антител TREM2 и инкубировали в течение одного часа на льду. Клетки анализировали с помощью FACS на связывания меченых CellTracker бактерий с клеточными линиями.

Антитела Ат21 и Ат52 к TREM2 ингибировали связывание бактерий *E.coli* как с клетками человека, так и клетками мыши, что указывает на конкурентное связывание антител с лиганд-связывающим сайтом на TREM2 (фиг. 8). Контрольные неагонистические антитела к TREM2 (Ат66 и Ат68) ингибировали связывание бактерий с клетками человека, экспрессирующими TREM2, но не ингибировали связывание с TREM2 мыши.

Пример 27. Резюме исследований функции антител TREM2.

В табл. 6 представлены результаты исследований функции, описанные выше в примерах 24-26. Антитела Ат21 и Ат52 демонстрировали индукцию фосфорилирования Syk в дендритных клетках человека (чДК), дендритных клетках мыши (мДК) и макрофагах мыши (мМак). Однако антитело Ат52 индуцировало более высокие уровни фосфорилированного Syk по сравнению с антителом Ат21 в ДК человека и мыши. Оба антитела были способны имитировать связывание лиганда с TREM2 человека и мыши, хотя антитело Ат21 продемонстрировало более эффективное связывание, о чем свидетельствует большее снижение бактериального связывания (см. пример 26 выше).

Таблица 6. Исследования функции антител TREM2

| Антитело | Индукция Фосфо Syk чДК | Индукция Фосфо Syk мДК | Индукция Фосфо DAP12 мМак | Мимический лиганд-связывающий сайт на Trem2 человека | Мимический лиганд-связывающий сайт на Trem2 мыши |
|-----------------|------------------------|------------------------|---------------------------|--|--|
| Ат52 | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| Ат21 | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Контроль изотип | - | - | - | - | - |
| а | | | | | |

Пример 28. TREM2 уменьшает секрецию воспалительных цитокинов из макрофагах мыши.

Для определения роли TREM2 в продуцировании воспалительных цитокинов культивировали макрофаги мышей дикого типа (ДТ), макрофаги мышей с нокаутным TREM2 (КО) и макрофаги гетерозиготных (Het) по TREM2 мышей с различными воспалительными медиаторами, и уровни цитокинов измеряли в культуральных супернатантах.

Для получения BMDM общий костный мозг от мышей дикого типа (ДТ), TREM2 КО (КО) и гетерозиготных (Het) по TREM2 культивируют в RPMI, обогащенной 10% телячьей сывороткой, 5% лошадиной сывороткой и 50 нг/мл рекомбинантным КСФ-1 мыши (R&D Systems). Клетки культивировали в течение 5-6 дней и адгезивные клетки отделяли с помощью 1 М ЭДТА в ФСБ. BMDM высевали на 96-луночные планшеты в количестве 10⁵ клеток/луночку и оставляли прилипать в течение 4 ч при 37°C. Затем клетки стимулировали с помощью агонистов TLR ЛПС (*Salmonella abortus equi*) или зимозана (*Saccharomyces cerevisiae*) в концентрациях от 0,01 до 100 нг/мл (ЛПС) или от 0,01 до 100 мкг/мл (зимозан). В альтернативном варианте макрофаги, выделенные из мышей ДТ, КО и Het, культивировали в присутствии 10 нг/мл цитокина ИЛ-4 или 50 нг/мл ИФН-γ. Супернатант клеточной культуры собирали через 24 или 48 ч после стимуляции и уровни цитокинов ФНОα, ИЛ-6, ИЛ-10 и МХБ-1 измеряли с использованием комплекта для цитометрии Cytometric Bead Array Mouse Inflammation (BD) в соответствии с протоколом про-

изводителя.

Макрофаги дикого типа (ДТ), стимулированные медиаторами воспаления ЛПС или зимозаном, выделяют менее воспалительные цитокины ФНО-альфа, ИЛ-6, ИЛ-10 и МХБ-1 по сравнению с TREM2 KO (TREM2^{-/-}) макрофагами (фиг. 9А). Аналогично макрофаги ДТ и Het (TREM2^{+/-}), обработанные медиатором ИФН γ , продуцировали менее воспалительные цитокины ИЛ-6 и ФНО-альфа по сравнению с макрофагами TREM2 KO (фиг. 9В). Макрофаги ДТ, Het и КО, культивируемые в присутствии цитокина ИЛ-4, продуцируют аналогичные низкие уровни ИЛ-6 и ФНО-альфа (фиг. 9В). Основываясь на этих результатах, антитела к TREM2 могут снижать секрецию воспалительных цитокинов из макрофагов.

Пример 29. TREM2 снижает экспрессию воспалительных маркеров на поверхности клеток макрофагов мыши.

Для определения роли TREM2 в экспрессии воспалительных маркеров культивировали макрофаги мышей дикого типа (ДТ), макрофаги мышей с нокаутным TREM2 (КО) и макрофаги гетерозиготных (Het) по TREM2 мышей с различными воспалительными медиаторами, и измеряли экспрессию поверхностных маркеров CD86 и CD206.

Макрофаги, выделенные из мышей ДТ, КО и Het высевали в чашки и оставляли приклеиваться в течение 4 ч при 37°C, и агонисты TLR ЛПС (*Salmonella abortus equi*) и зимозан (*Saccharomyces cerevisiae*) добавляли в концентрациях от 0,01 до 100 нг/мл (ЛПС) или 0,01-10 мкг/мл (зимозан). В альтернативном варианте макрофаги, выделенные из мышей ДТ, КО и Het, культивировали в присутствии цитокинов ИЛ-4 (10 нг/мл) или ИФН- γ (0,5-50 нг/мл). Анализ FACS CD86 и CD206 был выполнен на BD FACS Canto через 48 ч. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7.

Макрофаги дикого типа (ДТ), обработанные с помощью воспалительных медиаторов ИФН- γ (фиг. 10А), ЛПС или зимозана, (фиг. 10В) экспрессировали более низкие уровни воспалительного рецептора CD86, но не рецептора CD206, по сравнению с макрофагами TREM2 KO (TREM2^{-/-}). Аналогично макрофаги Het (TREM2^{+/-}), обработанные с помощью ИФН- γ , экспрессировали более низкие уровни CD86, но не CD206 по сравнению с макрофагами TREM2 KO (фиг. 10А). Основываясь на этих результатах, агонистические антитела к TREM2 могут снижать экспрессию воспалительных рецепторов на макрофагах.

Пример 30. TREM2 увеличивает выживаемость макрофагов и дендритных клеток.

Для оценки роли TREM2 в выживаемости клеток культивировали макрофаги дикого типа (ДТ) и нокаутные по TREM2 (КО) макрофаги, и дендритные клетки в присутствии медиаторов воспаления и измеряли выживаемость клеток.

Клетки-предшественники из мышинного костного мозга от мышей TREM2 ДТ, Het и КО получали путем промывки клеток тибиальных и феморальных клеток костного мозга холодным ФСБ. После одной промывки с помощью ФСБ эритроциты лизировали с использованием ACK Lysing Buffer (Lonza), дважды промывали с помощью ФСБ и суспендировали при 0.5×10^6 клеток/мл в полной среде RPMI (10% ФТС, Pen/Strep, Gln, neAA) с указанными количествами 50 нг/мл М-КСФ для получения макрофагов или 10 нг/мл ГМ-КСФ для получения дендритных клеток. Для макрофагов типа М2 в культивируемые клетки добавляли 10 нг/мл ИЛ-4. Для макрофагов типа М2 в культивируемые клетки добавляли 10 нг/мл ИЛ-4. В некоторых экспериментах ЛПС или зимозан добавляли к культуре клеток на 5-й день в диапазоне концентраций от 1 мкг/мл до 0,01 нг/мл. Рекомбинантные цитокины были приобретены у Peprotech.

Для анализа жизнеспособности макрофагов, полученных из костного мозга, клетки получали, как описано выше, и культивировали в МКСФ. Клетки высевали в количестве $10^5/200$ мкл в 96-луночный планшет (для анализа жизнеспособности с использованием анализа на основе люциферазы) или в количестве $0,5 \times 10^5/1$ мл в 6-луночный планшет (для подсчета методом исключения с помощью Tripan Blue), не обработанный для культивирования тканей. На третий день добавляли среду, содержащую свежий М-КСФ. В указанные моменты времени клетки осторожно отсоединяли от планшетов с помощью 3 мМ ЭДТА и подсчитывали, используя камеру Беркера. Для анализа FACS живых клеток макрофаги культивировали либо в 50 мкг/мл МКСФ в течение 6 дней (+МКСФ), либо в 50 мкг/мл МКСФ в течение 4 дней, прежде чем МКСФ удаляли в течение дополнительных 36 ч (-МКСФ). Клетки окрашивали с использованием антитела к CD11b и DAPI. Для анализа жизнеспособности люциферазы жизнеспособность клеток измеряли на 5-й день культивирования с помощью градуированных концентраций факторов роста GM-CSF (дендритные клетки), МКСФ (макрофаги М1) или МКСФ+ИЛ-4 (макрофаги М2). Клетки непосредственно инкубировали с реагентом ToxGlo (Promega) и люциферазную активность (люминесценцию) считывали, используя ридер XY. Для анализа FACS жизнеспособных макрофагов, культивируемых в присутствии медиаторов воспаления ИФН- γ , ЛПС или зимозана, клетки собирали на 5-й день и окрашивали с использованием антитела к CD11b и DAPI.

После 7 дней культивирования в МКСФ наблюдали значительно большее количество жизнеспособных (подсчет методом исключения с помощью Tripan Blue) макрофагов TREM2 ДТ и Het (TREM2^{+/-}), чем макрофагов TREM2 KO (TREM2^{-/-}) (фиг. 11А). Анализ FACS показал, что макрофаги ДТ, обработанные МКСФ в течение либо для 6 (+МКСФ), либо для 4 дней (-МКСФ), показали повышенную выживаемость по сравнению с макрофагами Het и КО, о чем свидетельствует более высокий процент живых

(CD11b+DAPI-) клеток (фиг. 11B). По результатам анализов люциферазы клетки ДТ, культивируемые в присутствии факторов роста GMCSF (дендритные клетки), МКСФ (макрофаги М1) или МКСФ+ИЛ-4 (макрофаги М2), выживали лучше, чем клетки КО, что было продемонстрировано более высоким показанием люминесценции в диапазоне концентраций фактора роста (фиг. 11C). Макрофаги дикого типа, культивированные с медиаторами воспаления (ИНФ- γ , ЛПС или зимозан), имели более высокую выживаемость, чем макрофаги TREM2 Het и КО, о чем свидетельствует более высокий процент CD11b+ живых клеток (фиг. 11D). Основываясь на этих результатах, агонистические антитела к TREM2 могут увеличивать выживаемость макрофагов и дендритных клеток, тогда как антагонистические антитела к TREM2 могут снижать выживаемость клеток.

Пример 31. Фагоцитоз, модулируемый TREM2.

Передача сигналов TREM2 участвует в фагоцитозных путях, включая бактериальный клиренс из легких и фагоцитоз апоптотических нейронов. Роль TREM2 в фагоцитозе оценивали с помощью измерения способности макрофагов мыши дикого типа (ДТ) и нокаутных по TREM2 (КО) макрофагов к фагоцитозу клеток *E.coli* и апоптотических клеток.

BMDM ДТ и TREM2 КО помещали на обедненную среду, содержащую 1% сыворотку RPMI, или сохраняли в культуре в присутствии МКСФ (50 нг/мл) в течение ночи. На следующий день клетки высевали в количестве 2×10^5 в 96-луночные планшеты (с круглым дном не тканевая культура) в присутствии или в отсутствие МКСФ. Клетки-мишени (CCL119) культивировали в течение ночи с 0,5 мкМ стауропорина для индукции апоптоза. На следующий день клетки промывали и метили с помощью 20 нг/мл pHrodo-SE (Invitrogen). Апоптотические клетки или биочастицы *E.coli* (pHrodo, Invitrogen) инкубировали при 37°C в течение 1 ч и 30 мин. Анализ останавливали на льду. После промывания холодным ФСБ клетки окрашивали для CD11b (pacific blue-CD11b, BD) и анализировали с помощью FACS. Во всех образцах BMDM отличались от апоптотических клеток и гранул окрашиванием CD11b, и стробирование проводили на основе эффекторных клеток, культивированных без клеток-мишеней. Для негативного контроля эффекторные клетки инкубировали в течение всего анализа цитохалазином D (2 мкМ, SIGMA). Фагоцитоз определяли количественно как (процент или СКП от PhRodo-положительных клеток) - (процент или СКП от PhRodo-положительных негативно контрольных клеток, обработанных цитохалазином D).

Макрофаги дикого типа (ДТ), культивированные с МКСФ, проявляют пониженный фагоцитоз апоптотических клеток и клеток *E.coli*, по сравнению с макрофагами TREM2 КО (TREM2^{-/-}), о чем свидетельствует более низкий процент клеток pHrodo+ (фиг. 12). И наоборот, макрофаги ДТ, культивированные без МКСФ, проявляют увеличенный фагоцитоз апоптотических клеток и клеток *E.coli*, по сравнению с макрофагами TREM2 КО, о чем свидетельствует более высокий процент клеток pHrodo+ (фиг. 12). Основываясь на этих результатах, агонистические антитела к TREM2 могут усиливать фагоцитоз в отсутствие МКСФ и снижать фагоцитоз в присутствии МКСФ. И наоборот, считается, что антагонистические антитела к TREM2 могут усиливать фагоцитоз в присутствии МКСФ и снижать фагоцитоз в отсутствие МКСФ.

Пример 32. Картирование эпитопов антител к TREM2.

Антитела TREM2 тестировали на их способность связывать 15 или 25 мерные пептиды, охватывающие весь TREM2 человека и мыши.

Линейные 15-мерные пептиды синтезировали на основе последовательности TREM2 человека или мыши с наложением длиной 14 остатков. Кроме того, линейные 25-мерные пептиды синтезировали на основе последовательности TREM2 человека или мыши со сдвигом 1-го остатка. Связывание антител TREM2 с каждым из синтезированных пептидов исследовали способом ИФА. В этом анализе пептидные матрицы инкубировали с раствором первичных антител (в течение ночи при 4°C). После промывки пептидные матрицы инкубировали с разведенным 1/1000 конъюгатом антитело-пероксидазы (SBA, кат. ном. 2010-05) в течение одного часа при 25°C. После промывки добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азинобис-3-этилбензтиазолинсульфоната (ABTS) и 2 мкл/мл 3% H₂O₂. Через час измеряли формирование цвета. Формирование цвета определяли с помощью камеры прибора с зарядовой связью (ПЗС) и системы обработки изображений.

Антитело Ат52 демонстрирует надежное связывание во всех наборах пептидов. Было показано, что антитело Ат52 распознает область N-концевого пептида между аминокислотными остатками 49-57 TREM2 человека и мыши (⁴⁹AWCRQLGEK⁵⁷ (SEQ ID NO: 444)) (фиг. 13). Область эпитопа, распознаваемая Ат52, соответствует аминокислотным остаткам 49-57 SEQ ID NO: 1 и имеет аминокислотную последовательность: AWCRQLGEK (SEQ ID NO: 444).

Было показано, что антитело Ат21 распознает область N-концевого пептида между аминокислотными остатками 43-50 TREM2 человека и мыши (⁴³HWGRRRAW⁵⁰ (SEQ ID NO: 445)). Область эпитопа, распознаваемая Ат21, соответствует аминокислотным остаткам 43-50 SEQ ID NO: 1 и имеет аминокислотную последовательность: HWGRRRAW (SEQ ID NO: 445).

Пример 33. Сравнение агонистических антител Ат52 и Ат21 к TREM2 с эталонными антителами к TREM2.

Эталонные антитела TREM2 сравнивали с агонистическими антителами Ат21 и Ат52, оценивая их

способность индуцировать фосфорилирование Syk и определяя их связывающий с TREM2 участок.

Клетки покрывали с использованием $1 \text{ мкг}/10^6$ клеток антителом к TREM2 MAB17291 (R&D Systems) или моноклональным антителом IgG1 крысы 78,18 (полученным из Калифорнийского университета, Сан-Франциско) и стимулировали с помощью перекрестного сшивания с вторичным антителом (козьим антителом к IgG $1,5 \text{ мкг}/10^6$ клеток). Фосфорилирование Syk оценивали в соответствии со способами, описанными в примере 24 выше.

Для оценки областей связывания антитела TREM2-Fc человека инкубировали с иммобилизованными полноразмерными агонистическими антителами к TREM2 At21 или At52 и затем добавляли антитела к TREM2 MAB17291 или 78,18. Эпитоп-специфическую сортировку антител проводили на системе Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA) с использованием стандартного сэндвич-анализа связывания (см., Estep et al., (2013) MABs 5(2):270-8). Контрольный по отношению к мишени IgG загружали на датчики AHQ, а незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали с помощью не релевантного человеческого антитела к IgG1. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ антигена мишени с последующим вторым антителом к мишени. Данные обрабатывались с использованием ForteBio's Data Analysis Software 7.0. Дополнительное связывание вторым антителом после ассоциации с антигеном указывает на незанятый эпитоп (неконкурирующий), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурирующий).

Эталонное антитело к TREM2 MAB17291 индуцирует фосфорилирование Syk в клетках ДТ, но не в клетках TREM2 KO (TREM2^{-/-}). Однако эталонное антитело к TREM2 78,18 не индуцировало фосфорилирование Syk в экспериментальных условиях (фиг. 14). Что отличается от At21 и At52, которые оба способны индуцировать фосфорилирование Syk в TREM2 BMDM мыши ДТ (фиг. 6).

Эталонное антитело MAB17291 было способно одновременно связывать TREM2 вместе с антителом At21 (фиг. 15A) или антителом At52 (фиг. 15B). Эти результаты демонстрируют, что агонистические антитела к TREM2 At21 и At52 связывают иные области белка TREM2 чем эталонное антитело MAB17291.

Пример 34. Анализ способности фрагментов Fab антитела к TREM2 стимулировать жизнеспособность врожденных иммунных клеток.

Агонистические функциональные свойства связанных на планшете, перекрестно-сшитых фрагментов Fab антител к TREM2, полученных от антител At21 и At52, оценивали на врожденных иммунных клетках (например, макрофагах).

Макрофаги, полученные из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутные по TREM2 (КО), культивировали в присутствии М-КСФ и фрагментов Fab связанных на планшете антител к TREM2, и измеряли жизнеспособность клеток.

Макрофаги, выделенные из костного мозга мышей ДТ и КО, высевали в не обработанных для культивирования тканей 96-луночных планшетах, предварительно покрытых либо $12,5 \text{ нМ}$, либо 100 нМ фрагментов Fab перекрестно-сшитых At21, или At52. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии $10 \text{ нг}/\text{мл}$ М-КСФ. Анализ жизнеспособности проводили с использованием комплекта Cell Titer Glo (Promega). Планшеты были прочитаны с помощью считывающего устройства для микропланшетов BioTek Synergy с использованием программного обеспечения GEN5 2.04.

Перекрестно-сшитые фрагменты Fab к TREM2, полученные из антител At21 и At52, увеличивали количество жизнеспособных макрофагов, полученных из костного мозга мыши, по сравнению с контрольным изотипом Fab At88, о чем свидетельствует более высокий % повышенной выживаемости (фиг. 16). Такое повышение жизнеспособности клеток не наблюдалось в макрофагах КО мыши. Эти данные указывают на то, что биологическая активность антител At21 и At52 специфична для TREM2, и что связанные на планшете перекрестно-сшитые фрагменты Fab At21 и At52 функционируют как агонисты для увеличения выживаемости макрофагов, культивируемых в М-КСФ.

Пример 35. Анализ способности антител к TREM2 к снижению выживаемости врожденных иммунных клеток.

Антагонистические функциональные свойства фрагментов Fab как растворимых, не перекрестно-сшитых антител к TREM2, полученных из антител At21 и At52, так и растворимых полноразмерных антител к TREM2 At21 и At52 оценивали на врожденных иммунных клетках (например, макрофагах).

Макрофаги, полученные из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутные по TREM2 (КО) макрофаги, культивировали в присутствии М-КСФ и фрагментов Fab растворимого антитела TREM2, или растворимых полноразмерных антител, и измеряли жизнеспособность клеток.

Макрофаги, выделенные из костного мозга мышей ДТ и КО, высевали в не обработанных для культивирования тканей 96-луночных планшетах в присутствии $20 \text{ нг}/\text{мл}$ М-КСФ и повышенных количеств указанных фрагментов Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2 или растворимых полноразмерных антител. Каждый вариант высевали в трех повторностях. Анализ жизнеспособности проводили с использованием комплекта Cell Titer Glo (Promega) через 3 дня. Планшеты были прочитаны с помощью считывающего устройства для микропланшетов BioTek Synergy с использованием программного обеспечения GEN5 2.04.

На фиг. 17 пунктирная линия "NT" указывает на среднюю жизнеспособность клеток, полученную у

необработанных макрофагов (без добавления антитела). Пунктирная линия "без МКСФ" указывает на среднюю жизнеспособность клеток, полученную при культивировании макрофагов в отсутствие М-КСФ.

Когда жизнеспособность клеток макрофагов оценивали с помощью фрагментов Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, результаты показали, что фрагменты Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученные из антитела Ат52, снижали жизнеспособность клеток (фиг. 17А). В противоположность этому, фрагменты Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученные из антитела Ат21, не ингибировали жизнеспособность и имели эффект, сопоставимый с контрольным изотипом Ат99 (фиг. 17А). Результаты показывают, что растворимый не перекрестно-сшитый Fab, полученный из антитела TREM2 Ат52, может функционировать в качестве антагониста и ингибировать выживаемость макрофагов *in vitro*.

Когда жизнеспособность клеток макрофагов оценивали с помощью растворимых полноразмерных антител, антитело Ат52 снижало жизнеспособность клеток более эффективно, чем Ат21 (фиг. 17В). Действительно, растворимое полноразмерное антитело Ат21 оказывало влияние на клетку, которое было сопоставимо с контрольным изотипом Ат91 (фиг. 17В). Результаты показывают, что растворимое полноразмерное антитело к TREM2 Ат52 может функционировать в качестве антагониста, если оно не перекрестно сшито или не кластеризовано, и ингибировать выживаемость макрофагов.

Результаты этих экспериментов показывают, что антитело к TREM2 Ат52 в отсутствие кластеризации может ингибировать выживаемость врожденных иммунных клеток, таких как макрофаги. В противоположность этому, результаты этих экспериментов показывают, что антитело к TREM2 Ат52 в отсутствие кластеризации может ингибировать выживаемость врожденных иммунных клеток, таких как макрофаги.

Пример 36. Анализ способности антител к TREM2 индуцировать TREM2-зависимые гены.

Способность связанных на планшете антител к TREM2 Ат21 и Ат52 активировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием репортерного гена люциферазы под контролем промотора NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток).

Клеточная линия, полученная из Т-лимфоцитов лимфомы тимуса мыши BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™), была инфицирована *Trem2* и *Dap12* мыши и вирусом Signal Lenti NFAT-Люцифераза (Qiagen). Полноразмерные антитела к TREM2 связывали на планшете при 10 мкг/мл в DPBS на обработанных тканевой культурой белых 96-луночных планшетах с чистым дном (100 мкл/лунку), в течение ночи при 4°C. Лунки трижды промывали DPBS и затем высевали 100000 клеток/лунка в среде с 1% сывороткой. В качестве положительного контроля для передачи сигналов добавляли РМА (0,05 мкг/мл) и иономицин (0,25 мМ). Клетки инкубировали в течение 6 ч и активность люциферазы измеряли добавлением OneGlo Reagent (Promega) в каждую лунку и инкубированием в течении 3 мин при комнатной температуре на планшетном шейкере. Люциферазный сигнал измеряли, используя планшет-ридер BioTek.

Как проиллюстрировано на фиг. 18А, антитела к TREM2 Ат 21 и Ат52 увеличивали активность люциферазы, что указывает на то, что антитела способны индуцировать TREM2-зависимую транскрипцию гена.

Как проиллюстрировано на фиг. 18В, связанный на планшете фосфатидилсерин (ФС), индуцирует TREM2-зависимую генную экспрессию. Считается, что ФС является природным лигандом TREM2. Таким образом, результаты, проиллюстрированные на фиг. 18 показывают, что агонистические антитела к TREM2 могут имитировать природный лиганд TREM2.

Способность связанных на планшете Fab антител Ат21 и Ат52 к TREM2 активировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием первичных макрофагов мыши. Макрофаги, полученные из костного мозга (ВММ), получали с М-КСФ в течение 5 дней. ВММ (10^5 /лунка) высевали на 96-луночные планшеты, которые предварительно покрывали Fab-частью антител Ат22 и Ат65 (50 нМ). Сверхчистый ЛПС (100 нг/мл *Escherichia coli* 0111:B4) добавляли после центрифугирования планшетов в течение 1 мин при 1200 об/мин. После 18 ч стимуляции с помощью ЛПС, цитокины, присутствующие в клеточных супернатантах, измеряли цитометрическим анализом на микросферах (СВА; BD Biosciences, комплект СВА для измерения воспаления у мыши).

Как проиллюстрировано на фиг. 18С и 18D, связанный на планшете Fab антител Ат22 и Ат52 TREM2 повышал уровни ИЛ-6 и МХБ-1, указывая на способность антител активировать TREM2-зависимые гены в первичных иммунных клетках.

Пример 37. Анализ способности антител к TREM2 ингибировать TREM2-зависимые гены.

Способность растворимых полноразмерных антител к TREM2 Ат21 и Ат52 ингибировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием репортерного гена люциферазы под контролем промотора NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток).

Клеточная линия, полученная из Т-лимфоцитов лимфомы тимуса мыши BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™), была инфицирована *Trem2* и *Dap12* мыши и вирусом Signal Lenti NFAT-Люцифераза (Qiagen). Растворимые полноразмерные антитела Ат 21 или Ат52 к TREM2 добавляли к клеткам в повышенной концентрации. Клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°C и измеряли активность люциферазы с использованием OneGlo Reagent (Promega).

Клетки отображают тоническую TREM2-зависимую передачу сигналов из-за присутствия эндогенного лиганда или спонтанной кластеризации рецепторов, что приводит к передаче сигналов TREM2.

Пунктирная линия на фиг. 19 показывает уровни активности TREM2 без стимуляции.

Как проиллюстрировано на фиг. 19, растворимое полноразмерное антитело к TREM2 Ат52 было способно ингибировать тоническую, TREM2-зависимую генную экспрессию. Растворимое полноразмерное антитело к TREM2 Ат21 было способно частично ингибировать тоническую, TREM2-зависимую генную экспрессию; однако уровни экспрессии генов были почти такими же, как уровни активности TREM2 без стимуляции (фиг. 19).

Пример 38. Резюме агонистической и антагонистической активности антитела TREM2.

В табл. 7 представлены результаты исследований функции, описанные выше в примерах 35-37. Антитела Ат21 и Ат52 демонстрировали агонистическую активность в активации TREM2-зависимой генной экспрессии с использованием репортерного гена люциферазы (фиг. 18) или репортерного гена бета-ГАЛ (табл. 7). Как указано в табл. 7, Ат21 показало повышенный уровень индукции гена по сравнению с Ат52, в случае если использовали репортерный ген люциферазы. Однако Ат52 показало повышенный уровень индукции гена по сравнению с Ат21, в случае если использовался репортерный ген beta-GAL (табл. 7). Антитела Ат22 и Ат52 также продемонстрировали агонистическую активность в стимулировании выживаемости врожденных иммунных клеток (фиг. 16). В табл. 7 дополнительно суммированы результаты, демонстрирующие антагонистическое действие растворимого, не перекрестно-сшитого антитела Ат52 на ингибирование выживаемости врожденных иммунных клеток (фиг. 17). В противоположность этому, растворимое, не перекрестно-сшитое антитело Ат21 обладало минимальной антагонистической активностью в ингибировании выживаемости клеток (фиг. 17).

Таблица 7. Агонистическая и антагонистическая активность антитела к TREM2

| Антитело | Люцифераза | бета-Гал | Выживаемость | Люцифераза |
|------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| | Агонистическая активность антитела | агонистическая активность антитела | Агонистическая активность антитела | Антагонистическая активность антитела в растворе/антагонистическом Ат формате |
| Ат52 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Ат21 | ++++ | ++ | +++ | -/+ |
| Контроль изотипа | - | - | - | - |

Пример 39. Анализ влияния агонистических антител к TREM2 на болезнь Альцгеймера.

Для оценки способности агонистических антител к TREM2 замедлять, предотвращать или способствовать регрессии развития болезни Альцгеймера (AD), мыши 5X FAD были использованы. Мыши 5X FAD сверхэкспрессируют мутантный APP человека (695) вместе со шведской (K670N, M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I) семейными мутациями болезни Альцгеймера (FAD) вместе с PS1, несущей две FAD мутации, M146L и L286V. Оба трансгена регулируются промотором Thy1 мыши для переноса экспрессии на мозг и повторения основных особенностей AD. Мыши, получавшие агонистические антитела к TREM2 или контрольные антитела, испытывали на нагрузку бляшками А бета с помощью иммуногистохимии и ИФА тканевых экстрактов. Они дополнительно испытываются на количество микроглии в головном мозге и на уменьшение когнитивного дефицита с использованием водного лабиринта Морриса, пространственного обучения и задач на память, радиального водного восьмирукавого лабиринта, Y-лабиринта (количественно определяет спонтанное чередование как меру пространственного познания), предпочтения новизны в открытом поле, оперантного научения для оценки обучения и памяти и условно-рефлекторного замирания ([mousebiology.org website](http://mousebiology.org); Wang et al., (2015) Cell, pii: S0092-8674(15)00127-0).

Пример 40. Продуцирование, идентификация и характеристика агонистических антител к TREM2.

Введение.

Антитела, которые связывают внеклеточный домен TREM2, в частности внеклеточный домен IgV (аминокислотные остатки 19-174 из SEQ ID NO: 1) создаются с использованием мышиной гибридомной технологии, технологии фагового дисплея и технологии дисплея дрожжей в соответствии со способами, описанными в примере 1 выше. Затем антитела подвергали скринингу на их способность связывать клетки, экспрессирующие TREM2, и на их способность активировать сигнальный путь TREM2 и функции в клетках, и в целом животном *in vivo* как описано в примерах 41-67 ниже.

Результаты.

Продуцирование антитела к TREM2.

Антитела, которые связывают внеклеточный домен TREM2, в частности в пределах внеклеточных

последовательностей, расположенных в аминокислотных остатках 113-174 из SEQ ID NO: 1, были получены с использованием следующей процедуры, описанной в примере 1.

Было получено 87 антител. Затем антитела подвергали скринингу на связывание TREM2. Антитела, которые были положительными на связывание с первичными клетками, были испытаны на агонистическую активность. Из 87 антител определенные антитела (например, Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65) были отобраны для дальнейшего анализа.

Последовательности переменного домена тяжелой цепи и легкой цепи антитела.

Используя стандартные методы, были определены аминокислотные последовательности, кодирующие тяжелую цепь (фиг. 20А) и легкую цепь (фиг. 20В) переменных доменов антител. Последовательности CDR антител по Kabat приведены в табл. 8.

Таблица 8. Последовательности CDR по Kabat

| Название антитела | CDR H1 | CDR H2 | CDR H3 | CDR L1 | CDR L2 | CDR L3 |
|-------------------|----------------|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ат1 | FTFSSYAMS | VISGSGGSTYYADSVKG | AKGTPTLFLFQH | RASQSVSSNLA | GASTRAT | QQLPYWPFPT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:25) | (SEQ ID NO:50) | (SEQ ID NO:120) | (SEQ ID NO:138) | (SEQ ID NO:153) |
| Ат2 | FTFSSSAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | AKVPSYDYWSGYSNYYYMDV | RASQSVGSNLA | GASTRAT | QQYFFYPFPT |
| | (SEQ ID NO:4) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:51) | (SEQ ID NO:121) | (SEQ ID NO:138) | (SEQ ID NO:154) |
| Ат3 | GTFSSYAIS | GIIPFGTANYAQKFG | AREQYHVGMDV | QASQDISNYLN | DASNLAT | QQPFNFPYPT |
| | (SEQ ID NO:5) | (SEQ ID NO:27) | (SEQ ID NO:52) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:139) | (SEQ ID NO:155) |
| Ат4 | GTFSSYAIS | GIIPFGTASYAQKFG | ARGVDSIMDY | RASQSVSSNLA | SASTRAT | QQDHDYFPT |
| | (SEQ ID NO:5) | (SEQ ID NO:28) | (SEQ ID NO:53) | (SEQ ID NO:120) | (SEQ ID NO:140) | (SEQ ID NO:156) |
| Ат5 | YTFTSYYIH | IINPSGGSTSYAQKFG | ARAPQESPYVFDI | RASQSVSSSYLA | GASSRAT | QQYFSSPFPT |
| | (SEQ ID NO:6) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:54) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:157) |
| Ат6 | YTFTSYYMH | IINPGGGSTSYAQKFG | ARGSPYGYLYDP | RASQSVSSSYLA | DASKRAT | QQRVNLFPPT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:30) | (SEQ ID NO:55) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:158) |
| Ат7 | YTFTSYYMH | IINPSGGSTTYAQKFG | ARTSSKERDY | RASQSVSSSYLA | DASKRAT | QQRISYPFIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:31) | (SEQ ID NO:56) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:159) |
| Ат8 | GSISSSSYWYG | SISYSGSTYYNPSLKS | ARGPYRLLGMDV | RASQSISSYLN | GASSLQS | QQIDDTFIT |
| | (SEQ ID NO:8) | (SEQ ID NO:32) | (SEQ ID NO:57) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:143) | (SEQ ID NO:160) |
| Ат9 | YSFTSYWIG | IIPGDSDTTYSFSPFQG | ARLHISGEVNWFDP | RASQSVSSSYLA | DASNRAT | QQFSYWPWT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:33) | (SEQ ID NO:58) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:161) |
| Ат10 | YSFTSNWIG | IIPGDSDTRYSPFQG | AREAGYDYGELAFDI | RASQSVSSSYLA | GASSRAT | QQHDSPPPT |
| | (SEQ ID NO:10) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:59) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:162) |
| Ат11 | YSFTTYWIG | IIPGDSDTRYSPFQG | ARAGHYDGGHLGMDV | RASQSVSSDYLA | GASSRAT | QQDYSYPWT |
| | (SEQ ID NO:11) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:60) | (SEQ ID NO:126) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:163) |
| Ат12 | YSFTSYWIG | IIPGDSDTRYSPFQG | ARLGHYSGTVSSYGMVDV | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQEYAVPYPT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:61) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:164) |
| Ат13 | YTFTSYGIS | WISAYNGNTNYAQKLG | ARGPSHYDLA | RASQSVSSSYLA | DASNRAT | QQVSNYPFIT |
| | (SEQ ID NO:12) | (SEQ ID NO:35) | (SEQ ID NO:62) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:165) |

| | | | | | | |
|------|----------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| At14 | GSISSGGYYWS | NIYYSGSTVYNPFLKS | ARGLYGYGVLDV | QASQDISNYLN | DASNLET | QQVDNIPPT |
| | (SEQ ID NO:13) | (SEQ ID NO:36) | (SEQ ID NO:63) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:166) |
| At15 | GSISSGGYYWS | NIYYSGSTVYNPFLKS | ARGLYGYGVLDV | QASQDISNYLN | DASNLET | QQFDTYPT |
| | (SEQ ID NO:13) | (SEQ ID NO:36) | (SEQ ID NO:63) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:167) |
| At16 | GSISSNSYYWG | SIYYSGSTYYNPSLKS | ARGVLYGYGVFDY | QASQDISNYLN | DASNLET | QQFLNFPT |
| | (SEQ ID NO:14) | (SEQ ID NO:37) | (SEQ ID NO:64) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:168) |
| At17 | GSISSNSYYWG | SIYYSGSTYYNPSLKS | ARGVLYGYGVFDY | QASQDISNYLN | DASNLET | QQFFNFPT |
| | (SEQ ID NO:14) | (SEQ ID NO:37) | (SEQ ID NO:64) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:169) |
| At18 | GSISSYYWS | SIYYSGSTNYNPSLKS | ARDGGGEYPSGTFFDI | QASQDISNYLN | DASNLET | QQFIDLFFPT |
| | (SEQ ID NO:15) | (SEQ ID NO:38) | (SEQ ID NO:65) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:170) |
| At19 | GSISSYYWS | SIYYSGSTNYNPSLKS | ARDGGGEYPSGTFFDI | QASQDISNYLN | DASNLET | QQYIDLFFPT |
| | (SEQ ID NO:15) | (SEQ ID NO:38) | (SEQ ID NO:65) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:171) |
| At20 | GSISSYYWS | SIYYSGSTNYNPSLKS | ARSGMASFFDY | RASQSVSSDYLA | GASSRAT | QQFSSHFFPT |
| | (SEQ ID NO:15) | (SEQ ID NO:38) | (SEQ ID NO:66) | (SEQ ID NO:126) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:172) |
| At22 | YSFTTYWIG | IIYPGDSSTRYSPFQG | ARAGHYDGGHLMVDV | RASQSVSSSYLA | GASSRAT | QQDDRSFYT |
| | (SEQ ID NO:11) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:60) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:173) |
| At23 | FTFSSYAMS | AISGSGGTTYADSVKG | AKLGGHSMVDV | KSSQSVLYSSNNKN YLA | WASTRES | QQAYLPPIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:67) | (SEQ ID NO:127) | (SEQ ID NO:147) | (SEQ ID NO:174) |
| At24 | FTFSSYAMS | AISGSGGTTYADSVKG | AKPLKRGRGFY | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQAFSPPPWT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:68) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:175) |
| At25 | FTFSSYAMS | VISGSGGTTYADSVKG | AKEGRTITMD | RASQSVSSSYLA | GASSRAT | QQDDRSPT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:25) | (SEQ ID NO:69) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:176) |
| At26 | FTFSSYAMS | VISGSGGTTYADSVKG | AKDQYSVIIDY | RASQSVSSSYLA | DASNRAT | QQRFDI.PPFT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:25) | (SEQ ID NO:70) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:177) |
| At27 | FTFSSYAMS | AISGSGGTTYADSVKG | AKKYSSRGVYFDY | RASQSVSSSYLA | DASNRAT | QQYNNFPPT |

| | | | | | | |
|------|----------------|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:71) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:178) |
| At28 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARLGGAVGARHVITYFDY | RASQSVSSYLA | DASKRAT | QQRYLRPIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:72) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:179) |
| At29 | FTFSSYGMH | VISYDGSNKYYADSVKG | ARGQYGGSGWFDP | RASQSVSSYLA | GASSRAT | QQPGAVPT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:39) | (SEQ ID NO:73) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:180) |
| At30 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARLQGEYAYFQH | RASQSISSYLN | GASSLQS | QQYITPIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:74) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:143) | (SEQ ID NO:181) |
| At31 | FTFSSYGMH | LIWYDGSNKYYADSVKG | ARRRDGYDEVFDI | QASQDISNFLN | DASNLET | QQPVDLPFT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:40) | (SEQ ID NO:75) | (SEQ ID NO:128) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:182) |
| At32 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARVPKHVVLDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQYSFFPPT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:76) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:183) |
| At33 | FTFSSYGMH | VISYDGSNKYYADSVKG | ARAGHLFDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQDSSFPT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:39) | (SEQ ID NO:77) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:184) |
| At34 | FTFSSYGMH | VISYDGSNKYYADSVKG | ARDRGGEYVDFAFDI | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQSDFPPWT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:39) | (SEQ ID NO:78) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:185) |
| At35 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARTRSYGASNYFDY | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQGYSAPIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:79) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:186) |
| At36 | FTFSTYGMH | VIWYDGSNKYYADSVKG | ARGTGAAASPAFDI | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQLFDWPT |
| | (SEQ ID NO:17) | (SEQ ID NO:41) | (SEQ ID NO:80) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:187) |
| At37 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARVGQYMLGMDV | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRAFLFT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:81) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:188) |
| At38 | FTFSTYGMH | VIWYDGSNKYYADSVKG | ARGAPVDYGGIEPEYFQH | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQIDFLPYT |
| | (SEQ ID NO:17) | (SEQ ID NO:41) | (SEQ ID NO:82) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:189) |
| At39 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | AKHYHVGIAFDI | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQVYSPFIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:83) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:190) |

| | | | | | | |
|------|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| At40 | FTFSSYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARTRSGYGASNYFDY | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQGYAAPIT |
| | (SEQ ID NO:3) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:79) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:191) |
| At41 | FTFSTYAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | ARAMARKSVAFDI | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRYALPIT |
| | (SEQ ID NO:18) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:84) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:192) |
| At42 | FTFSSSAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | AKVPSYQRGTAFDP | RASQSVSSYLA | GASSRAT | QQYASPPIT |
| | (SEQ ID NO:4) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:85) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:193) |
| At43 | FTFSSSAMS | AISGSGGSTYYADSVKG | AKSPAVAGIYRADY | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQVYSTPIT |
| | (SEQ ID NO:4) | (SEQ ID NO:26) | (SEQ ID NO:86) | (SEQ ID NO:129) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:194) |
| At44 | FTFSTYGMH | VIWYDGSNKYYADSVKG | ARGTGAAAASPAFDI | RASQSVSSYLA | DSSNRAT | QQLVHWPT |
| | (SEQ ID NO:17) | (SEQ ID NO:41) | (SEQ ID NO:80) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:148) | (SEQ ID NO:195) |
| At45 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARGPGYTTALDYYYMDV | RASQSVSSNLA | GASTRAT | QQLDDWFT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:87) | (SEQ ID NO:120) | (SEQ ID NO:138) | (SEQ ID NO:196) |
| At46 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARPAKTADY | RASQSVSSYLA | DSSNRAT | QQRSNYFIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:88) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:148) | (SEQ ID NO:197) |
| At47 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTTYAQKFQG | ARPGKSM DV | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRILYPIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:31) | (SEQ ID NO:89) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:198) |
| At48 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTTYAQKFQG | ARPGKSM DV | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRAAYFIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:31) | (SEQ ID NO:89) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:199) |
| At49 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARPAKTADY | RASQSVSSYLA | DASKRAT | QQRTSHPIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:88) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:200) |
| At50 | YTFTSYIH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARAPQESPYVFDI | RASQSVSSYLA | GASSRAT | QQYAGSPFT |
| | (SEQ ID NO:6) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:54) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:201) |
| At51 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARGVGGQDYYYMDV | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQFDDVFT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:90) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:202) |
| At53 | YTFTSYIH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARAPQESPYVFDI | RASQSVSSYLA | GASSRAT | QQYVNSPFT |
| | (SEQ ID NO:6) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:54) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:141) | (SEQ ID NO:203) |

| | | | | | | |
|------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| At54 | YTFTSYMH | IINPSSGGSTSYAQKFQG | ARGPGYTTALDYYYMDV | RASQSINSYLN | AASSLQS | QQSDDDPFT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:87) | (SEQ ID NO:130) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:204) |
| At55 | YTFTGSYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARGPLYHFMIFDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQLSTYPLT |
| | (SEQ ID NO:19) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:91) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:205) |
| At56 | YTFTGYMH | SINPNSGGTNYAQKFQG | ARASSVDN | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRSVYPIT |
| | (SEQ ID NO:20) | (SEQ ID NO:43) | (SEQ ID NO:92) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:206) |
| At57 | YTFTNYGIS | WISAYNGTNYAQKLQG | ARGPTKAYYSGSYVVFDP | RASQSVSSYLA | DASKRAT | QQVSLFPLT |
| | (SEQ ID NO:21) | (SEQ ID NO:35) | (SEQ ID NO:93) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:207) |
| At58 | YSFTSYWIG | IIPGDS DTRYSPSFQG | ARLGIYSTGATAFDI | RASQSISSWLA | DASSLES | LDYNSYSPIT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:94) | (SEQ ID NO:131) | (SEQ ID NO:149) | (SEQ ID NO:208) |
| At59 | YTFTGSYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARGGVWYSLFDI | QASQDISNYLN | DASNLET | QQHIALPFT |
| | (SEQ ID NO:19) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:95) | (SEQ ID NO:122) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:209) |
| At60 | YTFTGYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARASKMGDD | RASQSVSSYLA | DASKRAT | QQRASMPIT |
| | (SEQ ID NO:20) | (SEQ ID NO:44) | (SEQ ID NO:96) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:210) |
| At61 | YTFTSYGIH | WISAYNGTNYAQKLQG | ARGGVPRVSYFQH | RASQSVSSYLA | DSSNRAT | QQAFNRPPT |
| | (SEQ ID NO:22) | (SEQ ID NO:35) | (SEQ ID NO:97) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:148) | (SEQ ID NO:211) |
| At62 | YSFTSYWIG | IIPGDS DTRYSPSFQG | ARAGHYDDWSGLGLDV | RASQSVSSYLA | DASKRAT | QQSSVHPYT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:98) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:142) | (SEQ ID NO:212) |
| At63 | YTFTSYGIS | WISTYNGTNYAQKLQG | ARGSGSGYDSWYD | RASQGIDSWLA | AASSLQS | QQAYSLPPT |
| | (SEQ ID NO:12) | (SEQ ID NO:45) | (SEQ ID NO:99) | (SEQ ID NO:132) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:213) |
| At64 | YSFTSYWIG | IIPGDS DTRYSPSFQG | ARLGRWSSGTAFDI | RASQSVSSNLA | GASTRAT | QQDDDGYT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:100) | (SEQ ID NO:120) | (SEQ ID NO:138) | (SEQ ID NO:214) |
| At65 | YSFTSYWIG | IIPGDS DTRYSPSFQG | ARLGRKPSGSAFDI | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQDYSPWYT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:34) | (SEQ ID NO:101) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:215) |
| At66 | YTFTGSYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARAGHKTHDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRSAYPIT |
| | (SEQ ID NO:19) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:102) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:216) |

| | | | | | | |
|------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| At67 | YTFTSYMH | IINPSGGSTTYAQKFQG | ARPGKMDV | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRSHFPIT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:31) | (SEQ ID NO:89) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:217) |
| At68 | FTFSSYGMH | LIWYDGSNKYYADSVKG | AKPGSMTDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRANYFIT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:40) | (SEQ ID NO:103) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:218) |
| At69 | YTFGYSYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARAKSVDHDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRADYPIT |
| | (SEQ ID NO:19) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:104) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:219) |
| At70 | YTFGYYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARASKMGDD | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRSVYPIT |
| | (SEQ ID NO:20) | (SEQ ID NO:44) | (SEQ ID NO:96) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:206) |
| At71 | YTFTSYMH | IINPSGGSTNYAQKFQG | ARDISTHDYDLAFDI | RASQSVSSYLA | GASNRAT | QQAGSHFFT |
| | (SEQ ID NO:7) | (SEQ ID NO:29) | (SEQ ID NO:105) | (SEQ ID NO:123) | (SEQ ID NO:150) | (SEQ ID NO:220) |
| At72 | GSISYYWS | SIYYSGGTNYNPSLKS | ARSGTETLFDY | QASQDITNYLN | DASNLET | QQDVNYFFT |
| | (SEQ ID NO:15) | (SEQ ID NO:38) | (SEQ ID NO:106) | (SEQ ID NO:133) | (SEQ ID NO:146) | (SEQ ID NO:221) |
| At73 | YSFTSYWIG | IIYPGDSDTTYSFSFQG | ARAKMLDDGYAFDI | RASQSVSSNLA | GASTRAT | QQDDNYPYT |
| | (SEQ ID NO:9) | (SEQ ID NO:33) | (SEQ ID NO:107) | (SEQ ID NO:120) | (SEQ ID NO:138) | (SEQ ID NO:222) |
| At74 | YTFGYSYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARAGHKTHDY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQRSTFPIT |
| | (SEQ ID NO:19) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:102) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:223) |
| At75 | YTFGYYMH | WINPNSGGTNYAQKFQG | ARDLGYSSLLALDI | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQVSNYFFT |
| | (SEQ ID NO:20) | (SEQ ID NO:42) | (SEQ ID NO:108) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:224) |
| At76 | FTFSSYSMN | SISSSSYIYADSVKG | ARGGRRGDNNWFDP | KSSQSVLYSSNNKN YLA | WASTRES | QQYHDAFIT |
| | (SEQ ID NO:23) | (SEQ ID NO:46) | (SEQ ID NO:109) | (SEQ ID NO:127) | (SEQ ID NO:147) | (SEQ ID NO:225) |
| At77 | FTFSSYGMH | VISYDGSNKYYADSVKG | ARGPPHEMDY | KSSQSVLYSSNNKN YLA | WASTRES | QQAYVVPPT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:39) | (SEQ ID NO:110) | (SEQ ID NO:127) | (SEQ ID NO:147) | (SEQ ID NO:226) |
| At78 | FTFSSYGMH | VIWYDGSNKYYADSVKG | ARTPYPIWYFDL | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQADNWPPT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:41) | (SEQ ID NO:111) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:227) |

| | | | | | | |
|------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| At79 | FTFSSYSMN | YISGSSSTIYADSVKG | ARGRRHYGGMDV | RSSQSLHSNGYNY LD | LGSHRAS | MQALESPRT |
| | (SEQ ID NO:23) | (SEQ ID NO:47) | (SEQ ID NO:112) | (SEQ ID NO:134) | (SEQ ID NO:151) | (SEQ ID NO:228) |
| At80 | GTFSSYAIS | GIIPIFGTANYAQKFQG | ARGGGTFWSSGWSWALY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQYVNWFFT |
| | (SEQ ID NO:5) | (SEQ ID NO:27) | (SEQ ID NO:113) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:229) |
| At81 | GTFSSYAIS | GIIPIFGTANYAQKFQG | ARDSGNYDYWSGALRY | RASQSVSSYLA | DASNRAT | QQSSNWFFT |
| | (SEQ ID NO:5) | (SEQ ID NO:27) | (SEQ ID NO:114) | (SEQ ID NO:124) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:230) |
| At82 | GSISSGGYYWS | YIYSGSTVYNPFLKS | ARVSSSWYKA | RASQGISSWLA | AASSLQS | QQASTFPIT |
| | (SEQ ID NO:13) | (SEQ ID NO:48) | (SEQ ID NO:115) | (SEQ ID NO:135) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:231) |
| At83 | GSFSGYYWS | EIDHSGSTKYNPFLKS | ARVGVVVRGPGYSAFDI | RASQGISSWLA | AASSLQS | QQRNSLFLT |
| | (SEQ ID NO:24) | (SEQ ID NO:49) | (SEQ ID NO:116) | (SEQ ID NO:135) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:232) |
| At84 | YTFTSYGIS | WISTYNGNTNYAQKLQG | ARGSGSGYDSWYD | RASQSISSYLN | AASSLQS | QQSYDFPIT |
| | (SEQ ID NO:12) | (SEQ ID NO:45) | (SEQ ID NO:99) | (SEQ ID NO:125) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:233) |
| At85 | FTFSSYGMH | VIWYDGSNKYYADSVKG | AKDLGGYYGGAAYGMDV | RASQDISSWLA | AASSLQS | QQEVDYPLLT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:41) | (SEQ ID NO:117) | (SEQ ID NO:136) | (SEQ ID NO:145) | (SEQ ID NO:234) |
| At86 | FTFSSYGMH | VISYDGSNKYYADSVKG | AKDGVYVGLGNWFDP | RASQSISSWLA | KASSLES | QQLNYSPT |
| | (SEQ ID NO:16) | (SEQ ID NO:39) | (SEQ ID NO:118) | (SEQ ID NO:131) | (SEQ ID NO:152) | (SEQ ID NO:235) |
| At87 | GSISSYYWS | SIYSGSTNYPFLKS | ARHGWDVGVWFDP | RASQSVSRYLE | DASNRAT | QQYIFWFFT |
| | (SEQ ID NO:15) | (SEQ ID NO:38) | (SEQ ID NO:119) | (SEQ ID NO:137) | (SEQ ID NO:144) | (SEQ ID NO:236) |

Характеристика связывания At1, At9, At14, At22, At45 и At65.

Исходная характеристика антител TREM2 включала определение их способности связывать TREM2, экспрессируемых на дендритных и других первичных иммунных клетках человека или мыши. Клетки собирали, помещали в концентрации 10^5 /мл в 96-луночный планшет, промывали и инкубировали в 100 мкл ФСБ, содержащем 10-50 мкг/мл мАт и реагента, блокирующего Fc в течение 1 ч на льду. Затем клетки дважды промывали и инкубировали в 100 мкл ФСБ, содержащем 5 мкг/мл вторично антитела, конъюгированного с PE в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали в холодном ФСБ и оценивали количественно с помощью BD FACS Canto. Анализ данных и расчет значений MFI выполнялся с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7.

Антитела At1, At9, At14, At22, At45 и At65 демонстрировали связывание с клеточной линией мыши (BWZ T2), экспрессирующей рекомбинантную TREM2 мыши, как показано с помощью позитивного окрашивания антител TREM2, обнаруженным с помощью анализа FACS (гистограммы с черным контуром) (фиг. 21A). Негативный контроль изотипа (антитело At88) не продемонстрировал связывания. Антитела At1, At9, At14, At22, At45 и At65 демонстрировали связывание антител с макрофагами ДТ (Trem +/+), полученными из костного мозга мыши (BMMac, mMac), но не с TREM2-дефицитными (TREM2 -/-) макрофагами мыши (BMMac, mMac) (фиг. 21B). Антитела At1, At9, At14, At22, At45 и At65 демонстрируют связывание как с линией клеток человека (293), экспрессирующей рекомбинантный TREM2 человека (фиг. 4A) так и с первичными дендритными клетками человека (чДК) (фиг. 22B). И наоборот, антитела At43 и At60 связываются с линией клеток человека, экспрессирующей рекомбинантный TREM2 человека (фиг. 4A), но не связывался с первичными дендритными клетками человека (фиг. 22B).

Средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для типов клеток, связанных антителами At1, At9, At14, At22, At45 и At65 TREM2, приведены в табл. 9. Связывание сравнивают с родительской клеточной линией мыши (mTREM2 родительская клеточная линия BWZ), первичной клеточной линией человека (чTREM2 родительская клеточная линия (293)), первичными TREM2-дефицитными макрофагами мыши (mMac KO MFI) и первичными TREM2-дефицитными дендритными клетками мыши (мДК КО MFI). Результаты в табл. 9 показывают, что At1, At9, At14, At22, At45 и At65 связываются с клеточными линиями, сверхэкспрессирующими TREM2 человека и мыши на клеточной мембране, но не с

целью контроля клеточных линий, которые не экспрессируют TREM2. Антитела также связываются с первичными макрофагами человека и первичными макрофагами мыши, и дендритными клетками. Связывание с первичными клетками мыши является специфичным, поскольку оно не детектируется на первичных клетках, полученных от мышей TREM2 KO.

Таблица 9. Связывание антитела к TREM2 с клетками человека и мыши

| Антитело | mTrem2 Клеточная линия (BWZ-родительская) MFI | mTrem2 Клеточная линия (BWZ T2) MFI | чTrem2 родительская клеточная линия (293) MFI | чTrem2 клеточная линия (293) MFI | mМак КО MFI | mМак ДТ MFI | мДК КО MFI | мДК ДТ MFI | чДК % положительных |
|----------|--|--|---|----------------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------------|
| Ат1 | 960 | 12626 | 86 | 1491 | 69,8 | 82,3 | 235 | 393 | 64,9 |
| Ат9 | 1044 | 15691 | 83 | 2126 | 97,2 | 171,0 | 200 | 538 | 65,8 |
| Ат14 | 852 | 11550 | 87 | 1656 | 77,9 | 145,0 | 218 | 529 | 75,8 |
| Ат22 | 828 | 12451 | 82 | 1837 | 67,2 | 110,0 | 191 | 451 | 76,9 |
| Ат45 | 1022 | 16288 | 141 | 2058 | 86,2 | 141,0 | 277 | 652 | 78,8 |
| Ат65 | 1354 | 16122 | 93 | 1734 | 92,5 | 165,0 | 260 | 642 | 76,9 |

Аффинность связывания каждого антитела к TREM2 определяли путем измерения их K_D с помощью ForteBio или MSD-SET. Измерения аффинности с помощью ForteBio проводили, как описано ранее (Estep et al., (2013) MAbs 5(2):270-8). Вкратце, измерения аффинности с помощью ForteBio проводили путем загрузки IgG в режиме онлайн на датчики ANQ. Датчики уравнивали в режиме оффлайн в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления базовой линии. Датчики с загруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 5 мин, затем переносили в буфер для анализа в течение 5 мин для измерения скорости реакции. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1.

Измерения равновесной аффинности проводили, как описано ранее (Estep et al., (2013) MAbs 5(2):270-8). Титрования до конечной точки (SET) проводили в ФСБ+0,1% БСА без IgG (PBSF) при постоянной концентрации антигена 50 пМ и инкубировали с 3-5-кратным серийным разведением антитела, начиная с 10 нМ. Антитела (20 нМ в ФСБ) наносили на стандартные связующие MSD-ECL планшеты в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты блокировали в течение 30 мин при встряхивании со скоростью 700 об/мин, после чего проводили три промывки промывочным буфером (PBSF+0,05% Tween 20). Образцы SET наносили и инкубировали на планшетах в течение 150 сек при встряхивании со скоростью 700 об/мин с последующей однократной промывкой. Антиген, захваченный на планшете, обнаруживали с помощью 250 нг/мл сульфотаг-меченного стрептавидина в PBSF путем инкубации на планшете в течение 3 мин. Планшеты трижды промывали промывочным буфером и затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400 с использованием однократного буфера Read Buffer T с поверхностно-активным веществом. Процент свободного антигена наносили на график как функцию титруемого антитела в Prism и подвели к квадратному уравнению для получения значения K_D . Для повышения производительности использовались роботы для манипуляций в жидкости во всех экспериментах MSD-SET, включая подготовку образцов SET.

В табл. 10 перечислены значения, отражающие аффинность связывания (K_D) антител Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 к слитому белку TREM2 Fc человека (чTREM2-Fc), мономерный меченный His белок TREM2 человека (чTREM2-HIS) и слитый белок TREM2 Fc мыши (mTREM2-Fc).

Таблица 10. Аффинность связывания антител к TREM2

| Антитело | IgG K _D чTREM2-Fc (M) Авид | Моновалентный IgG K _D чTREM2-HIS (M) | IgG K _D мTREM2-Fc (M) Авид |
|----------|--|--|--|
| Ат1 | 7,05E-10 | 6,67E-09 | 4,86E-09 |
| Ат9 | 3,48E-10 | 6,32E-09 | Н.В. |
| Ат14 | 5,51E-10 | 3,19E-09 | 6,20E-10 |
| Ат22 | 3,06E-10 | 1,01E-09 | 3,40E-10 |
| Ат45 | 2,29E-10 | 6,54E-10 | Н.В. |
| Ат65 | 5,46E-10 | 5,01E-09 | 1,56E-09 |

Пример 41. Антитела TREM2 индуцируют экспрессию CD83 и CD86 на дендритных клетках человека (ДК) и индуцируют пролиферацию Т-клеток.

Для оценки способности антител к TREM2 модифицировать экспрессию CD83 и CD86 как связанные на планшете, так и растворимые антитела инкубировали с дендритными клетками (ДК) и измеряли экспрессию CD83 и CD86, и фосфорилированного ERK. Для оценки способности антител к TREM2 модулировать пролиферацию Т-клеток, ДК инкубировали с Т-клетками и антителами к TREM2 и измеряли уровень пролиферации Т-клеток.

Антитела высевали в течение ночи при 4°C в 12-луночных планшетах при концентрации 2 или 5 мкг/мл в ФСБ. На следующий день лунки промывали 3 раза с помощью ФСБ. На 5 день незрелые ДК человека собирали и высевали в количестве 1 миллион клеток на лунку, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в отсутствие цитокина. Анализ FACS CD86, CD83, CD11c, HLA-DR и LIN (BD Biosciences) был выполнен на BD FACS Canto через 48 ч. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7. Уровни CD83, CD86 и CCR7 оценивали на популяциях CD11c+HLA-DR+LIN-клеток. Для внутриклеточного фосфорилирования ERK клетки фиксировали 1%-ным формальдегидом, пермеабилizированным комплектом Cytofix/Cytoperm (BD), а внутриклеточное фосфорилирование Erk определяли с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителом PE-ERK (BD).

В альтернативном варианте 5-дневные незрелые дендритные клетки человека высевали в количестве 100000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном, не обработанный ТС, в среду без цитокина. Антитела добавляли в концентрации 5 мкг/мл с или без удаленного вторичного антитела человека к ЛПС (Jackson ImmunoResearch) в концентрации 20 мкг/мл. Анализ FACS CD86, CD83, CD11c, HLA-DR и LIN (BD Biosciences) выполняли через 48 ч после добавления антител, как описано выше.

Кроме того, 5-дневные незрелые дендритные клетки (CD14⁺CD11c⁺LIN⁻) высевали в 12-луночные планшеты, покрытые в предыдущий день антителом 2 мкг/мл. Пред добавлением Т-клеток планшеты промывали PBS трижды. Т-клетки CD4⁺ от неаутологических доноров выделяли и метили CFSE перед добавлением к ДК в соотношении 1:10, 1:50 или 1:250. CD3/CD28 Dynalbead служат в качестве положительного контроля. На 5-й день после совместного культивирования клетки анализировали проточной цитометрией на BD FACSCanto II для разведения CFSE. Для каждого условия с FlowJo (TreeStar) вычислялся процент CFSE^{hi} по сравнению с клетками CFSE^{lo}.

Связанные на планшете антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 увеличивали частоту CD83+CD86+ДК по сравнению с антителом контрольного изотипа Ат88 (фиг. 23А). Растворимые антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат45 и Ат65, когда перекрестно-сшиты с вторичным антителом к человеку, индуцируют экспрессию CD86 на ДК. И наоборот, перекрестно-сшитое антитело Ат22 и перекрестно-несшитые растворимые антитела не индуцировали экспрессию CD86 (фиг. 23В). Основываясь на этих результатах, антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 TREM2 функционируют как агонисты, чтобы индуцировать экспрессию воспалительных поверхностных маркеров CD83 и CD86 на дендритных клетках человека.

Пример 42. Антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат20, Ат22, Ат45 и Ат65 индуцируют фосфорилирование Syk.

Тирозинкиназа селезенки (Syk) является внутриклеточной сигнальной молекулой, которая функционирует после TREM2 в метаболическом пути путем фосфорилирования нескольких субстратов, таким образом, способствуя формированию сигнального комплекса, который приводит к клеточной активации и воспалительным процессам. Способность агонистических антител TREM2 индуцировать активацию Syk определяли путем культивирования макрофагов человека и мыши, и первичных дендритных клеток человека, и измерения состояния фосфорилирования белка Syk в клеточных экстрактах.

Макрофаги из костного мозга (BMDM), BMDM мыши ДТ, BMDM мыши с нокаутным (КО) TREM2 и первичные дендритные клетки человека помещали на обедненную среду в течение 4 ч, содержащую

1% сыворотку RPMI, и затем удаляли из чашек для тканевых культур с помощью ФСБ-ЭДТА, промывали ФСБ и подсчитывали. Клетки покрывали полноразмерными агонистическими антителами TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат20, Ат22, Ат45, Ат65, неагонистическими антителами (Ат16, Ат77) или контрольными антителами (Ат89 или Ат92) в течение 15 мин на льду. После промывания холодным ФСБ клетки инкубировали при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. После стимуляции клетки лизировали буфером для лизиса (1% об./об. NP-40%, 50 мл Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl₂, 10% глицерин, плюс ингибиторы протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16,000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. Затем лизаты иммунопреципитировали с помощью антитела к Syk (N-19 для BMDM или 4D10 для ДК человека, Santa Cruz Biotechnology). Осажденные белки фракционировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, переносили на ПВДФ-мембраны и зондировали с помощью антитела к фосфотирозину (4G10, Millipore). Для подтверждения того, что все субстраты были адекватно иммунопреципитированы, иммуноблоты были повторно зондированы с помощью антитела к Syk (Abcam, для BMDM) или антитела к Syk (Novus Biological, для ДК человека). Визуализацию проводили с помощью усовершенствованной системы хемилюминесценции (ECL) (GE Healthcare), как описано (например, Peng et al., (2010) *Sci Signal.*, 3(122): ra38).

Антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат20, Ат22, Ат45 и Ат65 индуцируют TREM2-опосредованное фосфорилирование Syk в BMDM, (фиг. 24А). Фосфорилирование Syk, индуцированное антителами Ат1, Ат9 и Ат45, является специфичным для TREM-2, поскольку фосфорилирование Syk не индуцируется, когда TREM2 KO BMDM используют в качестве контроля (фиг. 24В). Антитела TREM2 Ат22, Ат45 и Ат65 индуцируют фосфорилирование Syk в первичных дендритных клетках человека (фиг. 24С). Неагонистические антитела (Ат16 и Ат77) или контрольные антитела (Ат89 и Ат92) не индуцируют фосфорилирование Syk. Основываясь на этих результатах, антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат20, Ат22, Ат45, Ат65 функционируют как агонисты, чтобы индуцировать фосфорилирование Syk в макрофагах и дендритных клетках.

Пример 43. Антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 конкурируют с лигандом TREM2 для связывания с TREM2 человека и мыши.

Способность агонистических антител TREM2 распознавать сайт связывания лиганда с TREM2 оценивали с помощью анализа конкурентного связывания с использованием клеток *E.coli*, экспрессирующих предполагаемый лиганд TREM2.

E.coli выращивали в 10 мл среды LB O/N, собирали с помощью центрифугирования и дважды промывали в 10 мл ФСБ. *E.coli* затем подвергали термической инактивации путем инкубации в водяной бане при температуре 70°C в течение 30 мин. *E.coli* метили с помощью CellTracker DeepRed (ThermoFisher/Invitrogen, конечная концентрация 1 мкМ) и затем трижды промывали в 10 мл ФСБ, и ресуспендировали в 1 мл ФСБ в концентрации 10⁸/мл. Для конкурентного связывания бактерии добавляли к TREM2 мыши и к клеточной линии (BWZ), экспрессирующей DAP12, или к клеточной линии BW, экспрессирующей слитый белок TREM2/DAP12 человека, вместе с 10 мкг/мл полноразмерных агонистических антител TREM2 и инкубировали в течение одного часа на льду. Клетки анализировали с помощью FACS на связывания меченых CellTracker бактерий с клеточными линиями.

Антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 ингибировали связывание бактерий *E.coli* как с клетками человека, так и клетками мыши, что указывает на конкурентное связывание антител с лиганд-связывающим сайтом на TREM2 (фиг. 25). Контрольные неагонистические антитела TREM2 (Ат66 и Ат68) частично ингибировали связывание бактерий с клетками человека, экспрессирующими TREM2, но не ингибировали связывание с TREM2 мыши, что свидетельствует о том, что они являются более слабыми конкурентами связывания лиганда.

Пример 44. Антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат22, Ат45 и Ат65 индуцируют фосфорилирование DAP12 в макрофагах мыши.

TREM2 передает сигнал посредством DAP12, что приводит к нисходящей активации ФИЗК и других внутриклеточных сигналов. Способность агонистических антител к TREM2 индуцировать активацию DAP12 определяли путем культивирования макрофагов мыши и измерения состояния фосфорилирования белка DAP12 в клеточных экстрактах.

Перед стимуляцией мАт макрофаги мыши (ДТ) из костного мозга (BMDM) и BMDM мыши с нокаутным (KO) TREM2 помещали на обедненную среду в течение 4 ч, содержащую 1% сыворотку RPMI. 15×10⁶ клеток инкубировали на льду в течение 15 мин с полноразмерными агонистическими или контрольными антителами. Клетки промывали и инкубировали при 37°C в течение указанного периода времени в присутствии козьего антитела к IgG человека. После стимуляции клетки лизировали буфером для лизиса (1% об./об. NP-40%, 50 мл Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1,5 mM MgCl₂, 10% глицерин, плюс ингибиторы протеазы и фосфатазы) с последующим центрифугированием при 16,000 g в течение 10 мин при 4°C для удаления нерастворимых материалов. Клеточный лизат иммунопреципитировали вторым антителом TREM2 (R&D Systems). Осажденные белки фракционировали с помощью электрофореза ДСН-ПААГ, переносили на ПВДФ-мембраны и зондировали с помощью антитела к фосфотирозину (4G10, Millipore). Мембрану отделяли и повторно зондировали с помощью антитела к

DAP12 (Cells Signaling, D7G1X). Каждый клеточный лизат, использованный для иммунопреципитации TREM2, содержал равное количество белков, как было показано с помощью контрольного антитела (антитела к актину, Santa Cruz).

DAP12 осаждается совместно с TREM2 и фосфорилируется в макрофагах ДТ, инкубированных с агонистическими антителами TREM2 Ат1, Ат9, Ат22, Ат45 и Ат65 (фиг. 26А и 26В). И наоборот, фосфорилирование DAP12 не наблюдалось в макрофагах TREM2 КО (TREM2^{-/-}), инкубированных с антителами Ат1, Ат9, Ат22 или Ат45 (фиг. 26В). Эти результаты демонстрируют, что агонистические антитела Ат1, Ат9, Ат22 и Ат45 индуцируют фосфорилирование TREM2-ассоциированного DAP12 специфическим образом, так как фосфорилирование DAP12 отсутствует в TREM2-дефицитных BMDM.

Пример 45. Эпитопное картирование антител TREM2 и сравнение антител TREM2 с эталонными антителами TREM2.

Антитела TREM2 тестировали на их способность связывать 15 или 25 мерные пептиды, охватывающие весь TREM2 человека и мыши. Антитела TREM2 также сравнивали с эталонным антителом TREM2, определяя их связывающую область TREM2.

Линейные 15-мерные пептиды синтезировали на основе последовательности TREM2 человека или мыши с наложением длиной 14 остатков. Кроме того, линейные 25-мерные пептиды синтезировали на основе последовательности TREM2 человека или мыши со сдвигом 1-го остатка. Связывание антител к TREM2 с каждым из синтезированных пептидов исследовали методом, основанным на ИФА. В этом анализе пептидные матрицы инкубировали с раствором первичных антител (в течение ночи при 4°C). После промывки пептидные матрицы инкубировали с разведенным 1/1000 конъюгатом антитело-пероксидазы (SBA, кат. ном. 2010-05) в течение одного часа при 25°C. После промывки добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолинсульфоната (ABTS) и 2 мкл/мл 3% H₂O₂. Через час измеряли формирование цвета. Формирование цвета определяли с помощью камеры прибора с зарядовой связью (ПЗС) и системы обработки изображений.

Для оценки областей связывания антитела TREM2-Fc человека инкубировали с иммобилизованными полноразмерными агонистическими антителами TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45, Ат63, Ат65 или Ат87 и затем добавляли антитело TREM2 MAB17291 (R&D Systems). Эпитоп-специфическую сортировку антител проводили на системе Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA) с использованием стандартного сэндвич-анализа связывания (см., Estep et al., (2013) MAbs 5(2):270-8). Контрольный по отношению к мишени IgG загружали на датчики АНQ, а незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали с помощью не релевантного человеческого антитела к IgG1. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ антигена мишени с последующим вторым антителом к мишени. Данные обрабатывались с использованием ForteBio's Data Analysis Software 7.0. Дополнительное связывание вторым антителом после ассоциации с антигеном указывает на незанятый эпитоп (неконкурирующий), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурирующий).

Антитела Ат1, Ат9, Ат28 и Ат29 продемонстрировали сильное и прочное связывание исключительно для пептидов из Set1 и Set2, которые получают из последовательности человеческого TREM2. Все четыре антитела связывали пептиды, которые содержат область между аминокислотными остатками 139-146 человеческого TREM2 (¹³⁹GDLWFPGE¹⁴⁶ (SEQ ID NO: 237)) (фиг. 27А). Область эпитопа, распознаваемая Ат1, Ат9, Ат28 и Ат29 соответствует аминокислотным остаткам 139-146 из SEQ ID NO: 1 и имеет аминокислотную последовательность: GDLWFPGE (SEQ ID NO: 237).

Антитела Ат45 и Ат65 связываются только с 25-мерными пептидами из Set2 и Set4. Оба антитела распознавали высококонсервативную область TREM2 вблизи его С-конца между аминокислотными остатками 140-153 TREM2 человека (¹⁴⁰DLWFPGESESFEDA¹⁵³ (SEQ ID NO: 238)) и TREM2 мыши (¹⁴⁰DLWVPEESSSFEGA¹⁵³ (SEQ ID NO: 239)) (фиг. 27В). Область эпитопа, распознаваемая Ат45 и Ат65 соответствует аминокислотным остаткам 140-153 из SEQ ID NO: 1 и имеет аминокислотную последовательность: DLWFPGESESFEDA (SEQ ID NO: 238).

Также был определен также участок эпитопа, распознаваемый эталонным антителом MAB17291. Было обнаружено, что эталонное антитело MAB17291 распознает первый пептид, который содержит область между аминокислотными остатками 130-144 TREM2 человека (¹³⁰ADPLDHRDAGDLWFP¹⁴⁴ (SEQ ID NO: 240)) и второй пептид, который содержит область между аминокислотными остатками 158-170 TREM2 человека (¹⁵⁸SISRSLLEGEIPF¹⁷⁰ (SEQ ID NO: 241)). Области эпитопов, распознаваемые MAB17291 соответствуют аминокислотным остаткам 130-144 и 158-170 из SEQ ID NO: 1 и имеют аминокислотные последовательности: ADPLDHRDAGDLWFP (SEQ ID NO: 240) и ISRSLLEGEIPF (SEQ ID NO: 241).

Эталонное антитело MAB17291 было способно одновременно связывать TREM2 с антителом Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 или Ат65, но не с антителом Ат63 или Ат87 (фиг. 28). Эти результаты демонстрируют, что агонистические антитела TREM2 Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 связывают иные области белка TREM2 чем эталонное антитело MAB17291.

Пример 46. Резюме исследований функции антител TREM2.

В табл. 11 представлены результаты исследований функции, описанные выше в примерах 41-45. Антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 демонстрировали индукцию CD83 и CD86 на человеческих

дендритных клетках (чДК), причем более высокая индукция наблюдалась со связанным на планшете антителом, по сравнению с перекрестно-сшитым растворимым антителом (значения в таблице представляют процентное соотношение клеток CD83+CD86+). Антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 индуцировали различные уровни фосфорилирования Syk в дендритных клетках человека (чДК), мышинных дендритных клетках (мДК) и мышинных макрофагах (мМак) и были способны имитировать связывание лиганда (блокируя бактериальное связывание) TREM2 человека и мыши.

Таблица 11. Исследования функции антител TREM2

| Антитело | Индукция CD86 и CD83 человека чДК планшет | Индукция CD86 и CD83 человека чДК раствор | Индукция фосфо Syk чДК | Индукция фосфо Syk мДК | Индукция фосфо TREM2 и DAP12 мМак | Блокированное бактериальное связывание чTREM2 | Блокированное бактериальное |
|------------------|---|---|------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| Ат1 | 87,2 | 3,0 | -/+ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Ат9 | 79,3 | 5,6 | -/+ | +++ | ++++ | +++ | +++ |
| Ат14 | 78,7 | 1,9 | + | ++ | Н/Д | +++ | +++ |
| Ат22 | 74,5 | 1,2 | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Ат45 | 65,5 | 4,3 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Ат65 | 74 | 1,7 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Контроль изотипа | - | - | - | - | - | - | - |

Пример 47. Анализ роста опухоли у мышей с дефицитом.

TREM2 Группы из 10 мышей TREM2 дикого типа (ДТ), мышей, гетерозиготных (НЕТ) по TREM2 и нокаутных (КО) по TREM2 мышей (однопометники, соответствующего пола и возраста, возраст 8 недель (+/- 2 недели)) испытывают путем подкожного введения опухолевых клеток (например, 1×10^5 - 1×10^6 карциномы толстой кишки MC38, карциномы легких Льюиса или клеток меланомы B16), суспендированных в 100 мкл ФСБ. Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Для измерения роста опухоли, начиная с 4-го дня, рост опухоли отслеживается с помощью штангенциркуля каждые две недели. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 мм³ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются исходными показателями. Пониженный уровень приживания и скорости роста опухоли и уменьшенное количество инфильтрирующих опухоль иммуносупрессорных макрофагов указывают на повышенный приток эффекторных Т-клеток в опухоль у мышей TREM2 КО.

Для определения количества инфильтрирующих, ассоциированных с опухолью иммуносупрессорных макрофагов и Т-клеток используют группы из 6-8 однопометников, соответствующего пола и возраста. В возрасте 8 недель (+/- 2 недели) однопометники ДТ-НЕТ-КО подвергают подкожной инъекции опухолевыми клетками (то есть, 1×10^5 - 1×10^6 MC38, клетки легкого Льюис или клетки B16) суспендированными в 200 мкл Матригеля (Matrigel Matrix Growth Factor Reduced; BD). Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Через 7 и 10 дней после инъекции опухолевыми клетками, пробку из матригеля вырезают, инкубируют в течение 1 часа при 37°C с 1 мг/мл коллагеназы D (Sigma), диссоциируют с получением суспензии отдельных клеток и фильтруют через клеточный фильтр. Для определения количества Т-клеток, находящихся в опухоли, и соотношения между эффекторными Т-клетками и регуляторными Т-клетками, 5×10^6 клеток окрашивают с помощью антитела с PercpCy5.5 к CD45.2, антитела с FITC к CD3, антитела с PE-CY7 к CD8, антитела с APC к CD4, антитела с PE к FoxP3 (BD) и DAPI. Для определения количества клеток линии моноцитов/макрофагов, находящихся в опухоли, 5×10^6 клеток окрашивают с помощью антитела с PercpCy5.5 к CD45.2, антитела с PE-CY7 к CD11b, антитела с FITC к F4/80, антитела с APC к Ly6C/G, антитела с PE к CD86 и DAPI. Клетки получали на BD FACS Canto. Анализ данных выполнялся с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar) версии 10.0.7.

Пример 48. Анализ противоракового эффекта антагонистических антител TREM2.

Группы из 10 мышей C57B16/NTac в возрасте 8 недель (+/- 2 недели) подвергают подкожной инъекции опухолевыми клетками (например, от 1×10^5 до 1×10^6 MC38, клетки легкого Льюис или клетки

B16) суспендированные в 100 мкл ФСБ. Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Начиная с 2-го дня, группам мышей вводят в/б каждые 3 дня 4 дозы по 200 мкг каждого из антагонистических антител к TREM2, таких как те, что описаны в примерах 38 и 40. Для измерения роста опухоли, начиная с 4-го дня, рост опухоли отслеживается с помощью штангенциркуля каждые две недели. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 мм³ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются исходными показателями. Пониженный уровень приживания и скорости роста опухоли, уменьшенное количество инфильтрирующих опухоль иммуносупрессорных макрофагов и повышенный приток эффекторных Т-клеток в опухоль указывают на противораковые эффекты блокирования антител к TREM2.

Пример 49. Анализ аддитивного противоопухолевого эффекта комбинированной терапии, которая объединяет антитела к TREM2 с антителами к белкам, ингибирующим контрольную точку, или ингибирующим цитокинам/хемокинам и их рецепторам.

Группы из 15 мышей C57B16/NTac в возрасте 8 недель (+/- 2 недели) подвергают подкожной инъекции опухолевыми клетками, как описано в Примере 35. Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Начиная с 2-го дня, мышам каждые 3 дня внутривенно вводят по 4 дозы с 200 мкг антител исключительно к TREM2 или в комбинации с антителами к белкам контрольной точки (например, клон мАТ к PDL1 10F.9G2 и/или клон мАТ к CTLA4 UC10-4F10-11) на 3-, 6- и 9-й день. Группы лечения включают антитело к TREM2; антитело к CTLA4; антитело к PDL1; антитело к TREM2 и CTLA4; антитело к TREM2 и PDL1; и контроль изотипа. Для измерения роста опухоли, начиная с 4-го дня, рост опухоли отслеживается с помощью штангенциркуля каждые две недели. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 мм³ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются исходными показателями. Снижение роста опухоли и увеличение % выживаемости при комбинированной терапии указывают на то, что антитела к TREM2 обладают аддитивным или синергическим терапевтическим эффектом с антителами к белкам контрольной точки. Антагонистические антитела к молекулам контрольной точки включают антитела к PDL1, PDL2, PD1, CTLA4, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3 и фосфатидилсерину. Антагонистические антитела к ингибирующим цитокинам включают антитела к CCL2, КСФ-1 и ИЛ-2.

Пример 50. Анализ аддитивного противоопухолевого эффекта комбинированной терапии, которая объединяет антитела к TREM2 с антителами, которые активируют белки, стимулирующие контрольную точку.

Группы из 15 мышей C57B16/NTac в возрасте 8 недель (+/- 2 недели) подвергают подкожной инъекции опухолевыми клетками, как описано в Примере 35. Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Начиная с 2-го дня, мышам каждые 3 дня внутривенно вводят по 4 дозы с 200 мкг антител исключительно к TREM2 или в комбинации с агонистическими антителами, которые активируют белки, стимулирующие контрольную точку (например, мАТ OX40 или ICOS) на 3-, 6- и 9-й день. Для измерения роста опухоли, начиная с 4-го дня, рост опухоли отслеживается с помощью штангенциркуля каждые две недели. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 мм³ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются исходными показателями. Снижение роста опухоли и увеличение % выживаемости при комбинированной терапии указывают на то, что антитела к TREM2 обладают аддитивным или синергическим терапевтическим эффектом с антителами, стимулирующими контрольную точку. Антитела, стимулирующие контрольную точку, включают агонистические/стимулирующие антитела к CD28, ICOS, CD137, CD27, CD40 и GITR.

Пример 51. Анализ аддитивного противоопухолевого эффекта комбинированной терапии, которая объединяет антитела к TREM2 со стимулирующими цитокинами.

Группы из 15 мышей C57B16/NTac в возрасте 8 недель (+/- 2 недели) подвергают подкожной инъекции опухолевыми клетками, как описано в Примере 35. Животных анестезируют изофлураном до имплантации. Начиная с 2-го дня, мышам каждые 3 дня внутривенно вводят по 4 дозы с 200 мкг антител исключительно к TREM2 или в комбинации со стимулирующими цитокинами (например, ИЛ-12, ИФН- α). Для измерения роста опухоли, начиная с 4-го дня, рост опухоли отслеживается с помощью штангенциркуля каждые две недели. Конечной точкой эксперимента является объем опухоли 2000 мм³ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются исходными показателями. Снижение роста опухоли и увеличение % выживаемости при комбинированной терапии указывают на то, что антитела к TREM2 обладают аддитивным или синергическим терапевтическим эффектом с иммуностимулирующими цитокинами. Стимулирующие цитокины включают ИФН- α /b, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-18, ГМ-КСФ и Г-КСФ.

Пример 52. Анализ способности фрагментов Fab антитела к TREM2 стимулировать жизнеспособность врожденных иммунных клеток.

Агонистические функциональные свойства связанных на планшете перекрестно-сшитых фрагментов Fab антител к TREM2, полученных от антител Ат22, Ат45 и Ат65, оценивали на врожденных иммунных клетках (например, макрофагах).

Макрофаги, полученные из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутные по TREM2 (КО), культивировали в присутствии М-КСФ и фрагментов Fab связанных на планшете антител к TREM2, и

измеряли жизнеспособность клеток.

Макрофаги, выделенные из костного мозга мышей ДТ и КО, высевали в не обработанных для культивирования тканей 96-луночных планшетах, предварительно покрытых либо 12,5 нМ, либо 100 нМ фрагментов Fab перекрестно-сшитых Ат22, Ат45 или Ат65. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии 10 нг/мл М-КСФ. Анализ жизнеспособности проводили с использованием комплекта Cell Titer Glo (Promega). Планшеты были прочитаны с помощью считывающего устройства для микропланшетов BioTek Synergy с использованием программного обеспечения GEN5 2.04.

Перекрестно-сшитые фрагменты Fab к TREM2, полученные из антител Ат22, Ат45 и Ат65, увеличивали количество жизнеспособных макрофагов, полученных из костного мозга мыши, по сравнению с Fab контрольного изоформа Ат88, о чем свидетельствует более высокий % повышенной выживаемости (фиг. 29). Такое повышение жизнеспособности клеток не наблюдалось в макрофагах КО мыши, за исключением Ат65. Эти данные указывают на то, что биологическая активность антител Ат22 и Ат45 специфична для TREM2, и что связанные на планшете перекрестно-сшитые фрагменты Fab Ат22 и Ат45 функционируют как агонисты для увеличения выживаемости макрофагов, культивируемых в М-КСФ.

Пример 53. Анализ способности антител к TREM2 к снижению выживаемости врожденных иммунных клеток.

Антагонистические функциональные свойства фрагментов Fab как растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученных из антител, так и растворимых полноразмерных антител TREM2 оценивали на врожденных иммунных клетках (например, макрофагах).

Макрофаги, полученные из костного мозга мышей дикого типа (ДТ) и нокаутные по TREM2 (КО) макрофаги, культивировали в присутствии М-КСФ и фрагментов Fab растворимого антитела TREM2, или растворимых полноразмерных антител, и измеряли жизнеспособность клеток.

Макрофаги, выделенные из костного мозга мышей ДТ и КО, высевали в не обработанных для культивирования тканей 96-луночных планшетах в присутствии 20 нг/мл М-КСФ и повышенных количествах указанных фрагментов Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученных из Ат22, Ат45 и Ат65, или растворимых полноразмерных антител Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65. Каждый вариант высевали в трех повторностях. Анализ жизнеспособности проводили с использованием комплекта Cell Titer Glo (Promega) через 3 дня. Планшеты были прочитаны с помощью считывающего устройства для микропланшетов BioTek Synergy с использованием программного обеспечения GEN5 2.04.

На фиг. 30А и 30В, пунктирная линия "NT" указывает на среднюю жизнеспособность клеток, полученную у необработанных макрофагов (без добавления антитела). Пунктирная линия "без МКСФ" указывает на среднюю жизнеспособность клеток, полученную при культивировании макрофагов в отсутствии М-КСФ.

Когда жизнеспособность клеток макрофагов оценивали с помощью фрагментов Fab растворимых не перекрестно-сшитых антител TREM2, результаты показали, что фрагменты Fab растворимых не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученные из антитела Ат45, снижали жизнеспособность клеток (фиг. 30А). Напротив, фрагменты Fab растворимых не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученные из антитела Ат22, не ингибировали жизнеспособность и имели эффект, сопоставимый с контрольным изоформом Ат99 (фиг. 30А). Фрагменты Fab растворимых, не перекрестно-сшитых антител TREM2, полученные из антитела Ат65, частично ингибируют жизнеспособность клеток (фиг. 30А). Результаты показывают, что растворимый не перекрестно-сшитый Fab, полученный из антител TREM2 Ат45 и Ат65, может функционировать в качестве антагонистов и ингибировать выживаемость макрофагов *in vitro*.

Когда жизнеспособность клеток макрофагов оценивали с помощью растворимых полноразмерных антител, антитела Ат14, Ат45, Ат65 и Ат9 снижали жизнеспособность клеток (фиг. 30В).

Растворимое полноразмерное антитело Ат22 оказывало влияние на жизнеспособность клеток, которое было почти сопоставимо с таковым для контрольного изоформа Ат91 (фиг. 30В). Результаты показывают, что растворимые полноразмерные антитела к TREM2 Ат14, Ат45, Ат65 и Ат9 могут функционировать в качестве антагонистов, если они не перекрестно сшиты или не кластеризованы, и ингибировать выживаемость макрофагов.

Результаты этих экспериментов показывают, что антитела к TREM2 Ат45, Ат65 и Ат9 при отсутствии кластеризации могут ингибировать выживаемость врожденных иммунных клеток, таких как макрофаги. В противоположность этому, антитело к TREM2 Ат22, даже при отсутствии кластеризации, не ингибирует выживаемость клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги.

Пример 54. Анализ способности антител к TREM2 индуцировать TREM2-зависимые гены.

Способность связанных на планшете полноразмерных антител к TREM2 Ат1, Ат9, Ат10, Ат14, Ат15, Ат17, Ат18, Ат20, Ат22, Ат24, Ат25, Ат28, Ат29, Ат45, Ат54, Ат51, Ат64, Ат65 и Ат66 активировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием репортерного гена люциферазы под контролем промотора NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток).

Клеточная линия, полученная из Т-лимфоцитов лимфомы тимуса мыши BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™), была инфицирована *Trem2* и *Dap12* мыши и вирусом Signal Lenti NFAT-Люцифераза (Qiagen). Полноразмерные антитела к TREM2 связывали на планшете при 10 мкг/мл в DPBS на обработанных тка-

новой культурой белых 96-луночных планшетах с чистым дном (100 мкл/лунку), в течение ночи при 4°C. Лунки трижды промывали DPBS и затем высевали 100000 клеток/лунка в среде с 1% сывороткой. В качестве положительного контроля для передачи сигналов добавляли РМА (0,05 мкг/мл) и иономицин (0,25 мМ). Клетки инкубировали в течение 6 ч и активность люциферазы измеряли добавлением OneGlo Reagent (Promega) в каждую лунку и инкубированием в течении 3 мин при комнатной температуре на планшетном шейкере. Люциферазный сигнал измеряли, используя планшет-ридер BioTek.

Как проиллюстрировано на фиг. 31А и 31В, антитела к TREM2 Ат1, Ат9, Ат10, Ат14, Ат15, Ат17, Ат20, Ат22, Ат45, Ат54, Ат64, Ат65 и Ат66 увеличивали активность люциферазы, что указывает на то, что антитела способны индуцировать TREM2-зависимую транскрипцию гена. Как проиллюстрировано на фиг. 31С, связанный на планшете фосфатидилсерин (ФС) индуцирует TREM2-зависимую генную экспрессию. Считается, что ФС является природным лигандом TREM2. Таким образом, результаты, проиллюстрированные на фиг. 31А-С показывают, что агонистические антитела к TREM2 могут имитировать природный лиганд TREM2.

Пример 55. Анализ способности антител к TREM2 ингибировать TREM2-зависимые гены.

Способность растворимых полноразмерных антител к TREM2 Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 ингибировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием репортерного гена люциферазы под контролем промотора NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток).

Клеточная линия, полученная из Т-лимфоцитов лимфомы тимуса мыши BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™), была инфицирована Trem2 и Dapl2 мыши и вирусом Signal Lenti NFAT-Люцифераза (Qiagen). Растворимые полноразмерные антитела к TREM2 добавляли к клеткам в повышенной концентрации. Клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C и измеряли активность люциферазы с использованием OneGlo Reagent (Promega).

Клетки отображают тоническую TREM2-зависимую передачу сигналов из-за присутствия эндогенного лиганда или спонтанной кластеризации рецепторов, что приводит к передаче сигналов TREM2.

Пунктирная линия на фиг. 32 показывает уровни активности TREM2 без стимуляции.

Как проиллюстрировано на фиг. 32, растворимые полноразмерные антитела к TREM2 Ат9, Ат14, Ат45 и Ат65 были способны ингибировать тоническую, TREM2-зависимую генную экспрессию. В противоположность этому, растворимое полноразмерное антитело к TREM2 Ат22, по-видимому, не блокирует тоническую передачу сигналов TREM2 (фиг. 32).

Пример 56. Резюме агонистической и антагонистической активности антитела TREM2.

В табл. 12 представлены результаты исследований функции, описанные выше в примерах 52-55. Антитела Ат1, Ат9, Ат14, Ат22, Ат45 и Ат65 демонстрировали агонистическую активность в активации TREM2-зависимой генной экспрессии с использованием репортерного гена люциферазы (фиг. 31А) либо репортерного гена beta-GAL (табл. 12). Как указано в табл. 12, Ат1 и Ат65 показали повышенный уровень индукции гена по сравнению с Ат9, Ат22 и Ат45, в случае если использовался репортерный ген beta-GAL (табл. 12). Антитела Ат22, Ат45 и Ат65 также продемонстрировали агонистическую активность в стимулировании выживаемости врожденных иммунных клеток (фиг. 29). В табл. 12 дополнительно суммированы результаты, демонстрирующие антагонистическое действие растворимых, не перекрестно-сшитых антител Ат9, Ат14, Ат45 и Ат65 на ингибирование выживаемости врожденных иммунных клеток (фиг. 30). В противоположность этому, растворимое, не перекрестно-сшитое антитело Ат22 обладает минимальной антагонистической активностью в ингибировании выживаемости клеток (фиг. 30).

Таблица 12. Исследования функции антител TREM2

| Антитело | Люцифераза | бетаГАЛ | Выживаемость | Люцифераза |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| | Агонистическая активность антитела | Агонистическая активность антитела | Агонистическая активность антитела | Антагонистическая активность антитела в растворе/антагонистическом формате |
| Ат1 | ++++ | +++ | НД | НД |
| Ат9 | ++++ | + | НД | ++++ |
| Ат14 | ++++ | НД | НД | +++ |
| Ат22 | ++++ | + | +++ | - |
| Ат45 | ++ | + | ++ | ++++ |
| Ат65 | +++ | +++ | + | +++ |

| | | | | |
|----------------------|---|---|---|---|
| Контроль изоотипа | - | - | - | - |
|----------------------|---|---|---|---|

Пример 57. Резюме исследований связывания и функции для дополнительных антител TREM2.

В табл. 13 представлены результаты исследования связывания и функции для дополнительных полноразмерных антител TREM2, полученных, как описано в Примере 40. Нижеследующие результаты были получены с использованием способов, описанных в примерах 40 и 42.

Таблица 13. Исследования связывания и функции для других антител TREM2

| Антитело | IgG K _D чTREM2-Fc (M) Авид | IgG K _D чTREM2- HIS (M) t | IgG K _D mTREM2-Fc (M) Авид | MFI клеточного связывания mTrem2 | MFI клеточного связывания чTrem2 | Фосфо Syk чДК | Фосфо Syk мДК |
|----------|---|---|---|---|---|------------------|------------------|
| Ат2 | 5,92E-10 | 2,41E-08 | N.B. | 1432 | 1407 | нд | нд |
| Ат3 | 4,90E-10 | 1,42E-08 | N.B. | 488 | 1693 | нд | нд |
| Ат4 | 9,71E-10 | P.F. | N.B. | 295 | 1343 | нд | нд |
| Ат5 | 6,97E-10 | 3,00E-08 | N.B. | 310 | 1336 | - | нд |
| Ат6 | 4,44E-09 | P.F. | 8,51E-09 | 228 | 816 | нд | нд |
| Ат7 | 1,05E-09 | 3,34E-08 | 1,11E-09 | 10934 | 1249 | нд | нд |
| Ат8 | 7,23E-10 | 1,50E-08 | N.B. | 523 | 1623 | нд | нд |
| Ат10 | 5,44E-10 | 4,79E-09 | P.F. | 11486 | 1788 | ++ | ++ |
| Ат11 | 9,34E-10 | 7,20E-09 | 1,19E-09 | 5495 | 1909 | нд | нд |
| Ат12 | 1,19E-09 | 2,68E-09 | 7,91E-09 | 1552 | 1930 | - | нд |
| Ат13 | 1,49E-09 | 6,67E-08 | 1,71E-09 | 3246 | 971 | нд | нд |
| Ат15 | 6,05E-10 | 3,03E-09 | 2,80E-09 | 4755 | 1611 | нд | + |
| Ат16 | 1,09E-09 | 2,47E-09 | 1,36E-09 | 6382 | 1545 | нд | - |

042890

| | | | | | | | |
|------|----------|----------|----------|-------|------|----|----|
| Ат17 | 7,92E-10 | 3,46E-09 | 1,67E-09 | 10312 | 1604 | НД | + |
| Ат18 | 5,13E-10 | 6,77E-09 | N.B. | 5164 | 1924 | ++ | + |
| Ат19 | 4,65E-10 | 4,49E-09 | N.B. | 2304 | 1993 | ++ | НД |
| Ат20 | 6,58E-10 | 3,62E-09 | N.B. | 11245 | 1556 | НД | + |
| Ат23 | 9,67E-10 | P.F. | 6,83E-09 | 919 | 2653 | НД | НД |
| Ат24 | 4,79E-10 | P.F. | 9,32E-09 | 2760 | 1882 | НД | + |
| Ат25 | 6,84E-10 | 4,51E-09 | 5,98E-09 | 2497 | 1884 | НД | - |
| Ат26 | 4,81E-10 | 3,60E-09 | N.B. | 2551 | 1421 | НД | НД |
| Ат27 | 1,33E-09 | P.F. | 6,39E-09 | 2163 | 1316 | НД | НД |
| Ат28 | 9,15E-10 | P.F. | 7,45E-09 | 5248 | 1487 | НД | - |
| Ат29 | 2,36E-09 | P.F. | 3,27E-09 | 4518 | 1193 | НД | - |
| Ат30 | 1,32E-09 | P.F. | N.B. | 399 | 1421 | НД | НД |
| Ат31 | 4,51E-10 | 6,82E-09 | N.B. | 551 | 1760 | НД | НД |
| Ат32 | 9,95E-10 | 2,48E-08 | 1,35E-08 | 756 | 1202 | НД | НД |
| Ат33 | 1,42E-09 | 1,60E-08 | N.B. | 413 | 1352 | НД | НД |
| Ат34 | 7,06E-10 | 2,70E-08 | N.B. | 395 | 1770 | НД | НД |
| Ат35 | 2,21E-10 | 7,82E-09 | 6,44E-09 | 931 | 1391 | НД | НД |
| Ат36 | 4,65E-10 | 4,01E-09 | N.B. | 1258 | 1896 | НД | НД |
| Ат37 | 1,58E-09 | P.F. | N.B. | 1433 | 1434 | НД | НД |
| Ат38 | 9,60E-10 | 1,31E-08 | N.B. | 297 | 1832 | НД | НД |
| Ат39 | 2,13E-09 | P.F. | 6,41E-09 | 588 | 9029 | НД | НД |
| Ат40 | 1,97E-10 | 7,97E-09 | 6,03E-09 | 577 | 1452 | НД | НД |
| Ат41 | 2,14E-09 | P.F. | 8,64E-09 | 373 | 1017 | НД | НД |
| Ат42 | 4,03E-09 | P.F. | N.B. | 387 | 1234 | НД | НД |
| Ат43 | 4,37E-09 | P.F. | N.B. | 418 | 918 | НД | НД |
| Ат44 | 5,62E-10 | 9,46E-09 | N.B. | 1206 | 1249 | НД | НД |
| Ат46 | 4,45E-10 | 1,68E-08 | 2,46E-09 | 4257 | 1528 | НД | НД |

042890

| | | | | | | | |
|------|----------|----------|----------|-------|------|-----|-----|
| Ат47 | 4,31E-10 | 7,37E-09 | 1,45E-09 | 10123 | 1833 | НД | НД |
| Ат48 | 3,50E-10 | 9,08E-09 | 1,41E-09 | 9770 | 1412 | НД | НД |
| Ат49 | 4,35E-10 | 1,74E-08 | 2,08E-09 | 4315 | 1392 | НД | НД |
| Ат50 | 7,29E-10 | 3,64E-08 | N.B. | 325 | 1435 | НД | НД |
| Ат51 | 2,84E-10 | 1,64E-09 | N.B. | 12077 | 1928 | ++ | + |
| Ат52 | 1,51E-09 | 5,75E-09 | 8,96E-11 | 15613 | 1411 | +++ | +++ |
| Ат53 | 6,35E-10 | 2,16E-08 | N.B. | 843 | 1338 | НД | НД |
| Ат54 | 5,00E-10 | 3,02E-09 | N.B. | 11001 | 1931 | НД | ++ |
| Ат55 | 2,22E-09 | 9,17E-08 | 1,17E-09 | 6221 | 911 | НД | НД |
| Ат56 | 1,03E-09 | 5,18E-08 | 2,71E-09 | 743 | 1157 | НД | НД |
| Ат57 | 4,36E-10 | 1,83E-08 | 5,98E-10 | 10226 | 1227 | НД | НД |
| Ат58 | 5,75E-10 | 2,73E-09 | N.B. | 1870 | 1698 | НД | НД |
| Ат59 | 8,54E-10 | 5,72E-09 | N.B. | 3901 | 1754 | НД | НД |
| Ат60 | 5,59E-09 | P.F. | P.F. | 1871 | 741 | НД | НД |
| Ат61 | 4,61E-09 | P.F. | N.B. | 10517 | 1101 | НД | НД |
| Ат62 | 7,72E-10 | 1,42E-08 | P.F. | 4746 | 1647 | НД | НД |
| Ат63 | 1,13E-09 | 4,96E-08 | N.B. | 1722 | 1347 | НД | НД |
| Ат64 | 9,45E-10 | 6,57E-08 | P.F. | 8676 | 1458 | +++ | + |
| Ат66 | 1,98E-09 | 6,07E-08 | 3,88E-09 | 4098 | 1161 | НД | + |
| Ат67 | 6,60E-10 | 3,45E-08 | 2,92E-09 | 6207 | 1118 | НД | НД |
| Ат68 | 6,68E-09 | 1,09E-07 | 3,26E-09 | 2103 | 1135 | НД | НД |
| Ат69 | 3,75E-09 | 5,97E-08 | 3,40E-09 | 629 | 957 | НД | НД |
| Ат70 | 6,26E-09 | P.F. | 3,45E-09 | 3265 | 833 | НД | НД |
| Ат71 | 2,77E-09 | 6,47E-08 | N.B. | 804 | 1556 | НД | НД |
| Ат72 | 8,39E-10 | 2,94E-08 | P.F. | 3746 | 1500 | НД | НД |
| Ат73 | 4,10E-09 | P.F. | N.B. | 1117 | 1307 | НД | НД |
| Ат74 | 9,43E-09 | P.F. | 4,91E-09 | 1360 | 645 | НД | НД |

| | | | | | | | |
|----------------|--|----------|----------|------|------|----|----|
| Ат75 | 5,88E-09 | P.F. | N.B. | 276 | 676 | НД | НД |
| Ат76 | 4,84E-09 | P.F. | N.B. | 1604 | 580 | НД | НД |
| Ат77 | P.F. | P.F. | N.B. | 1650 | 951 | НД | НД |
| Ат78 | 8,51E-10 | 3,73E-08 | N.B. | 433 | 1435 | НД | НД |
| Ат79 | 1,07E-08 | P.F. | N.B. | 738 | 900 | НД | НД |
| Ат80 | 5,72E-09 | P.F. | 8,85E-09 | 593 | 897 | НД | НД |
| Ат81 | 1,01E-08 | P.F. | N.B. | 400 | 994 | НД | НД |
| Ат82 | 1,10E-08 | N.B. | 5,82E-09 | 712 | 371 | НД | НД |
| Ат83 | 8,21E-09 | N.B. | N.B. | 1576 | 684 | НД | НД |
| Ат84 | 1,16E-09 | 6,04E-08 | N.B. | 799 | 1148 | НД | НД |
| Ат85 | 5,72E-09 | P.F. | 2,19E-09 | 1121 | 460 | НД | НД |
| Ат86 | 3,89E-09 | P.F. | 6,55E-09 | 355 | 840 | НД | НД |
| Ат87 | 9,51E-09 | N.B. | 4,48E-09 | 1228 | 414 | НД | НД |
| 88 контроль | Нет связывания | НД | НД | 90.7 | 187 | - | - |
| 89 контроль | Нет связывания | НД | НД | 142 | 185 | - | - |
| Антитело | Люцифераза Агонистическая активность антитела | | | | | | |
| Ат10 | ++++ | | | | | | |
| Ат15 | ++++ | | | | | | |
| Ат17 | ++++ | | | | | | |
| Ат18 | - | | | | | | |
| Ат20 | +++ | | | | | | |
| Ат24 | - | | | | | | |
| Ат25 | - | | | | | | |
| Ат28 | - | | | | | | |

| | |
|---------------------|-----|
| Ат51 | +++ |
| Ат29 | – |
| Ат54 | +++ |
| Ат64 | +++ |
| Ат66 | +++ |
| Ат89 | – |
| Ат90 | – |
| Контроль изотипа | – |
| РМА/Ион | +++ |

Пример 58. Анализ противоинсультного эффекта агонистических антител TREM2.

Временная окклюзия средней мозговой артерии (МСАО) - модель, которая является очень похожей на человеческий инсульт и используется для индукции ишемического инсульта у мышей. Хирургическую мононить (70SPRe, Docol Corp, США) вводят во внутреннюю сонную артерию через разрез правой общей сонной артерии. Среднюю мозговую артерию окклюдировали в течение 30 мин с интервалом времени реперфузии (6, 12, 24 ч, 2, 7 и 28 дней). Эффект хирургии контролируют с использованием контрольных животных через 12 ч и на 7 сутки. Контрольные животные подвергаются той же хирургической процедуре, но без окклюзии средней мозговой артерии. Животные МСАО, обработанные агонистическими антителами к TREM2 или контрольными антителами, испытывают на инфарктную волюметрию, острый воспалительный ответ (12 ч реперфузии), транскрипцию провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 α и ИЛ-1 β , активность микроглии (CD68, Iba1), транскрипцию хемокинов CCL2 (МХБ1), CCL3 (MIP1 α и рецептор хемокина CX3CR1, и инвазию CD3-позитивных Т-клеток (Sieber et al. (2013) PLoS ONE 8(1): e52982. doi:10.1371/journal.pone.0052982.).

Пример 59. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при инфекциях дыхательных путей.

Для оценки способности антагонистических антител к TREM2 замедлять, предотвращать или лечить инфекции дыхательных путей, используют доклиническую мышиную модель, включающую заражение мышей C57B16 *Streptococcus pneumoniae*. Эта модель включает в себя интраназальное (внутрибрюшинное) введение 105 КОЕ *S. pneumoniae* серотипа 3 (ATCC 6303) как описано (см., например, Sharif O. et al., 2014 PLoS Pathog. 2014 Июнь; 10(6): e1004167; и Schabbauer G. et al., 2010 J. Immunol. 185: 468-476). В этой модели 90% мышей C57B16 ДТ погибают от инфекции в течение 6 дней после инфицирования.

Десять-пятнадцать мышей/группа заражали *S.pneumoniae* и одновременно обрабатывали антагонистическими антителами к TREM2 через день, начиная со дня 0. Первая доза антител к TREM2 вводится за 3 ч до заражения *S.pneumoniae*. Мышей обследовали ежедневно в течение 15 дней, чтобы проверить наличие смертельных исходов. Определяли % выживших мышей после заражения бактериями.

В отдельных вариантах реализации изобретения также определяли количество бактериальной нагрузки и экспрессию цитокинов в крови и в легких. Через 24 или 48 ч после инфицирования кровь собирали в пробирки, содержащие ЭДТА, и помещали на чашки с агаром для подсчета бактериальных КОЕ в плазме. Плазму хранили при -20°C для анализа цитокинов с помощью метода ИФА. Легкие собирали, гомогенизировали и наносили на чашки с агаром для подсчета бактериальных КОЕ или инкубировали в течение 30 мин в буфере для лизиса, и анализировали супернатанты для измерения цитокинов.

В отдельных экспериментах легкие собирали через 40 ч после бактериальной инфекции, фиксировали в 10% формалине и помещали в парафин для анализа патологии с помощью метода H&E.

Пример 60. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при сепсисе.

Для оценки способности антагонистических антител к TREM2 замедлять, предотвращать или лечить сепсис, используют доклиническую мышиную модель с участием мышей C57B16 с ЛПС с системной проблемой. Эта модель включает внутрибрюшинное (в/б) введение 37 мг/мл ЛПС, как описано (см., например, Gawish R. et al., 2014 FASEB J). В этой модели > 95% мышей C57B16 ДТ погибают от инфекции в течение 40 ч после инъекции ЛПС.

Когортам мышей вводили ЛПС и одновременно обрабатывали антагонистическими антителами к TREM2 каждый день, начиная со дня 0. Первая доза антител к TREM2 вводится за 3 ч до введения ЛПС. Мышей обследовали каждые ~ 4 ч в дневное время, чтобы проверить наличие смертельных исходов. Определяли процент выживших мышей после введения ЛПС.

В отдельных экспериментах собирали перитонеальную лаважную жидкость (PLF). Супернатанты хранили при -20°C для проведения анализа на цитокины методом ИФА; осажденные клетки подсчитывали для количественного определения воспалительных клеток, набранных в брюшинной полости. Аналогичные исследования могут быть проведены для проверки эффективности антител TREM2 на других моделях инфекции (см., например, Sun et al., (2013) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17;54 (5):3451-62).

Пример 61. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при остром и хроническом колите.

Для оценки способности антагонистических антител к TREM2 замедлять, предотвращать или лечить колит используют доклинические модели острого или хронического колита на мышах. Для DSS-индуцированного колита, мыши получают 3% DSS в питьевой воде ad libitum в течение 8 дней. Для TNBS-индуцированного колита мышей анестезировали и обрабатывали внутриванальной инъекцией 3 мг TNBS в 20% этаноле (об./об.) или только несущей средой в качестве контроля. Для модели хронического колита все мыши обрабатывали 3 циклами 2% DSS в течение 5 дней с последующим 10-дневным восстановительным периодом. Для всех моделей, потеря веса, консистенция кала и наличие скрытой фекальной крови отслеживались ежедневно и использовались для расчета индекса активности заболевания, как описано (см., например, Correale C, 2013, *Gastroenterology*, февраль 2013, pp. 346-356.e3).

Когорту мышей обрабатывали агонистическими антителами к TREM2 каждый день, начиная с 0 дня, и подвергали введению DSS или TNBS. Мышей обследовали каждый день с целью проверки потери веса, консистенции кала и наличия скрытой фекальной крови и использовали для расчета индекса активности заболевания, как описано (см., например, S. Vetrano, *Gastroenterology*, 135 (2008), pp. 173-184).

В отдельных экспериментах собирали эндоскопические и гистологические изображения поврежденной слизистой оболочки для оценки инфильтрации воспалительных клеток и повреждения слизистой оболочки. Аналогичные исследования могут быть проведены для проверки пользы антител TREM2 на других аутоиммунных моделях, включающих болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника и язвенный колит (см., например, Low et al., (2013) *Drug Des Devel. Ther.*; 7: 1341-1357; и Sollid et al., (2008) *PLoS Med* 5(9): e198).

Пример 62. Анализ защитного эффекта агонистических антител TREM2 при заживлении ран.

Для оценки способности агонистических антител к TREM2 улучшать заживления ран толстой кишки после травмы использовали мышиную модель биопсийного повреждения в толстой кишке. В этой модели эндоскоп с внешней операционной оболочкой вставляется в среднюю нисходящую ободочную кишку, и слизистая оболочка обследуется до аноректального перехода. Затем, одна полнослойная площадь всей слизистой и подслизистой оболочек удаляется с помощью гибких биопсийных щипцов с диаметром 3 по французской шкале диаметров, избегая при этом проникновения в мышечную оболочку. Каждая мышь получила биопсийное повреждение в 3-5 участках вдоль дорзальной стороны толстой кишки (см., например, Seno H., 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009 январь 6; 106(1): 256-261).

Когорту мышей обрабатывали агонистическими антителами к TREM2 через 2 или 3 дня после биопсийного повреждения. Мыши отслеживаются каждый день в течение 15 дней, чтобы проверить потерю веса и заживление ран путем измерения площади поверхности повреждений.

Пример 63. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при дегенерации сетчатки.

Антагонистические антитела TREM2 уменьшают накопление и/или функцию воспалительных макрофагов и, как следствие, замедляют, предупреждают и/или лечат возрастную макулярную дегенерацию (ВМД).

ВМД является дегенеративным заболеванием наружной сетчатки. Считается, что воспаление, особенно воспалительные цитокины и макрофаги, способствуют прогрессированию заболевания ВМД.

Наличие макрофагов в непосредственной близости от очагов ВМД документировано в друзах, мембране Бруха, сосудистой оболочке глаза и сетчатке. Макрофаги выделяют тканевый фактор (ТФ) и фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), который запускает образование новых кровеносных сосудов у пациентов, показывающих хориоидальную неоваскуляризацию.

Тип макрофагов, присутствующих в макулярной сосудистой оболочке глаза, изменяется с возрастом, демонстрируя повышенные уровни макрофагов M2 в глазах пожилых людей по сравнению с глазами более молодых людей. Тем не менее, расширенные пятна ВМД имели более высокие отношения M1 к M2 по сравнению с обычными аутопсированными глазами аналогичного возраста (см., например, Cao X et al. (2011), *Pathol. Int.* 61(9): pp.528-35). Это предполагает связь между классической активизацией макрофагов M1 в глазу при позднем начале прогрессирования ВМД.

Клетки микроглии сетчатки представляют собой резидентные тканевые макрофаги, которые также обычно присутствуют во внутренней сетчатке. В случае повреждения микроглии может быть активирована и действовать как медиатор воспаления. Активированная микроглия была обнаружена в образцах тканей ВМД и была предложена в качестве одного из потенциальных участников процесса воспаления, которые приводят к патогенезу ВМД (Gupta et al., (2003) *Exp. Eye Res.*, 76(4): 463-71). Способность антагонистических антител TREM2 предотвращать, замедлять или обращать ВМД тестируют на одной или более моделях ВМД (см., например, Pennesi et al., (2012) *Mol. Aspects Med.*; 33(4): 487-509).

Общие воспалительные макрофаги (или M1 и/или активированная микроглия) задокументированы как такие, которые коррелируют с прогрессией заболевания ВМД и поэтому представляют собой терапевтическую мишень для антагонистических антител TREM2. Подобная терапевтическая польза может быть достигнута при глаукоме и генетических формах дегенерации сетчатки, таких как пигментный ретинит.

Способность антагонистических антител TREM2 предотвращать, замедлять или обращать дегенерацию ганглионарных клеток сетчатки при глаукоме испытывают в модели глаукомы (см., например, El-Danaf et al., (2015). *J. Neurosci.* 11;35(6):2329-43). Точно так же испытывают терапевтическую пользу TREM2 в генетически индуцированной дегенерации сетчатки и пигментном ретините, как описано у Chiang et al., (2002) *Vision Res.*; 42(4):517-25 и в "Retinal Degeneration Rat Model Resource Availability of P23H and S334ter Mutant Rhodopsin Transgenic Rats and RCS Inbred and RCS Congenic Strains of Rats," MM LaVail, Июнь 30, 2011.

Пример 64. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при адипогенезе и ожирении, вызванном диетой.

Для проверки эффекта антагонистических антител TREM2 при адипогенезе и ожирении, используется модель мышей на диете с высоким содержанием жира (HFD) (см., например, Park et al., (2015) *Diabetes.* 64(1):117-27).

Пример 65. Анализ защитного эффекта антител TREM2 при малярии.

Экспрессия TREM2 в непаренхимальных клетках печени тесно коррелирует с устойчивостью к стадии инфицирования печени малярийным агентом *Plasmodium berghei* (Gongalves et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 26;110(48):19531-6). Не привязываясь к теории, считается, что антитела TREM2 повышают сопротивляемость стадии инфекции печени с *P. berghei*.

Способность антител TREM2 повышать устойчивость к малярийной инфекции тестировалась, как описано в Gongalves et al., (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 26;110 (48):19531-6. Кратко, экспрессирующие GFP спорозоиты *P.berghei* ANKA получали путем рассечения зараженных слюнных желез москитов *Anopheles Stephensi*. Спорозоитовые суспензии в среде RPMI инъецировали в/в в 100 мкл инокулята, содержащего 10^4 спорозоитов на мышь. Печень собирали через 40 ч после инъекции или выживания, а паразитемию проводили в течение 28 дней. Для экспериментальной оценки церебральной малярии неврологические симптомы отслеживали с 5-го дня после инъекции.

Пример 66. Анализ защитного эффекта антагонистических антител TREM2 при остеопорозе.

Кость представляет собой динамичный орган, постоянно реконструирующийся для поддержания гомеостаза кальция и структурных потребностей. Остеокласт является клеткой, ответственной за удаление как органических, так и неорганических компонентов кости. Остеокласт происходит от гемопоэтических предшественников в линии макрофагов и дифференцируется в ответ на действие активаторов рецептора цитокинов семейства факторов некроза опухоли лиганда NFκB. Остеокласты, как единственные клетки, резорбирующие костную ткань, играют центральную роль в патогенезе остеопороза и остеопетроза (Novack et al., (2008) *Annual Rev Pathol.*, 3:457-84).

Остеопороз является прогрессирующим заболеванием костей, которое характеризуется уменьшением массы и плотности костной ткани, что может привести к повышенному риску перелома. В основном это проявляется в первые годы после менопаузы, когда ускоряется ремоделирование кости, с повышением активности как остеокластов, так и остеобластов. Однако из-за дисбаланса в процессах резорбции и синтеза, общий эффект проявляется в потере костной ткани, которая в значительной степени является трабекулярным веществом кости. Таким образом, наиболее распространенными местами перелома при остеопорозе являются запястье, шейка бедра и тела позвонков, в которых трабекулярная структура является ключевым фактором общей прочности кости. Ускоренная дифференциация остеокластов и увеличенная способность резорбции кости, приводящие к остеопорозу, описаны на животных моделях, лишенных экспрессии TREM2 (Otero et al. (2012) *J. Immunol.* 188, 2612-2621).

Уменьшение функции остеокластов приводит к остеопетрозу, с увеличением костной массы и элиминацией пространства костного мозга, согласно наблюдениям у животных моделей, лишенных сигнального адаптера DAP12 ITAM, и также приводит к существенному дефекту дифференциации остеокластоподобных клеток (Koga, et al. (2004) *Nature* 428: 758-763).

Без ограничения теорией полагают, что введение антагонистического антитела к TREM2 по настоящему описанию может предотвратить, снизить риск и/или излечить остеопороз. В некоторых вариантах реализации изобретения введение агонистического антитела к TREM2 может индуцировать одну или более активностей TREM2 у индивидуума, имеющего остеопороз (например, фосфорилирование DAP12, активацию Syk и ускоренную дифференциацию в остеокласты) (Peng et al. (2010). *Sci. Signal.* 2010 18; 3 122; и Humphrey et al., (2006) *J. Bone Miner Res.*, 21 (2):237-45).

Пример 67. Способность антител At22 и At45 TREM2 блокировать индукцию TREM2-зависимой генной экспрессии.

Антитела At22 и At45 тестировали на их способность блокировать индукцию TREM2-зависимой генной экспрессии липидными лигандами с использованием люциферазной репортерной системы.

Фосфатидилсерин (ФС, Avanti Lipids) и сфингомиелин (СМ, Avanti Lipids) растворяли в метаноле и

высевали на 96-луночные планшеты Immulon. Метанол выпаривали в течение ночи при комнатной температуре и клетки добавляли на следующий день. Клетки BWZ, экспрессирующие TREM2 и DAP12 мыши в сочетании с NFAT-люциферазным репортером (Qiagen), собирали и добавляли в количестве 100000 клеток/лунка в DMEM+1% FBS. Клетки либо высевали отдельно, либо в комбинации с 50 или 5 нМ IgG человека. Через шесть часов активность люциферазы измеряли с использованием реагента OneGlo (Promega) и считывателя планшетов Biotek, в соответствии с инструкциями производителя.

At45 блокирует индукцию TREM2-зависимой экспрессии гена с помощью как ФС, так и СМ, о чем свидетельствует уменьшение люминесценции (фиг. 33).

Пример 68. Анализ способности антител TREM2 индуцировать TREM2-зависимые гены цитокинов.

Способность связанных на планшете Fab антител At22 и At65 к TREM2 активировать TREM2-зависимые гены оценивали с использованием первичных макрофагов мыши.

Макрофаги, полученные из костного мозга (BMDM), получали с М-КСФ в течение 5 дней. BMDM (10^5 /лунка) высевали на 96-луночные планшеты, которые предварительно покрывали Fab-частью антител At22 и At65 (50 нМ). Сверхчистый ЛПС (100 нг/мл *Escherichia coli* 0111:B4) добавляли после центрифугирования планшетов в течение 1 мин при 1200 об/мин. После 18 ч стимуляции с помощью ЛПС, цитокины, присутствующие в клеточных супернатантах, измеряли цитометрическим анализом на микросферах (CBA; BD Biosciences, комплект CBA для измерения воспаления у мыши).

Как проиллюстрировано на фиг. 34А и 34В, связанный на планшете, Fab антитела At22 к TREM2 увеличивал уровни ИЛ-6 и МХБ-1, указывая на способность антител активировать TREM2-зависимые гены цитокинов в первичных иммунных клетках.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, причем антитело получено с помощью эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 43-50 SEQ ID NO: 1 или аминокислотные остатки на белке TREM2, соответствующие аминокислотным остаткам 43-50 SEQ ID NO: 1.

2. Выделенное человеческое или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, причем антитело получено с помощью эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 49-57 SEQ ID NO: 1 или аминокислотные остатки на белке TREM2, соответствующие аминокислотным остаткам 49-57 SEQ ID NO: 1.

3. Выделенное человеческое или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, причем антитело получено с помощью эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 140-153 SEQ ID NO: 1 или аминокислотные остатки на белке TREM2, соответствующие аминокислотным остаткам 140-153 SEQ ID NO: 1.

4. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, причем указанное антитело промотирует выживаемость одной или более клеток врожденной иммунной системы, выбранных из макрофагов или клеток микроглии, когда оно перекрестно-сшито или связано на планшете.

5. Выделенное антитело по любому из пп.1-4, причем антитело конкурирует за связывание с TREM2 с одним или более лигандами TREM2.

6. Выделенное антитело по п.5, причем один или более лигандов TREM2 выбраны из группы, состоящей из клеток *E.coli*, фосфатидилсерина и сфингомиелина.

7. Выделенное антитело по любому из пп.1-6, причем антитело:

- i. повышает экспрессию CD83 и CD86; и/или
- ii. индуцирует фосфорилирование Syk; и/или
- iii. повышает экспрессию ИЛ-6; и/или
- iv. повышает экспрессию МХБ-1.

8. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, причем выделенное антитело:

- i. имеет константу диссоциации (K_D) для слитого белка человеческого TREM2-Fc, которая находится в диапазоне от около 0,23 нМ до около 1,51 нМ; и/или
- ii. имеет константу диссоциации (K_D) для мономерного белка человеческого TREM2, которая находится в диапазоне от около 0,65 нМ до около 5,75 нМ.

9. Выделенное антитело по любому из пп.1 и 4-8, причем, когда антитело не перекрестно-сшито или не связано на планшете, антитело не ингибирует выживаемость макрофагов.

10. Выделенное антитело по любому из пп.2-8, причем, когда антитело не перекрестно-сшито или не связано на планшете, антитело ингибирует выживаемость макрофагов.

11. Выделенное человеческое или гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком TREM2, причем выделенное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 404, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405, и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 406, и переменный домен легкой цепи содержит HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 407.

IgG2, IgG3 или IgG4.

20. Выделенное антитело по п.19, причем:

i. выделенное антитело имеет изотип человеческого IgG2 и включает одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU;

ii. выделенное антитело имеет изотип человеческого IgG2, при этом человеческий IgG2 содержит константную область, и при этом константная область человеческого IgG2 содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную замену C214S, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU;

iii. выделенное антитело имеет изотип человеческого или мышинового IgG1 и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и любой их комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU;

iv. выделенное антитело имеет изотип IgG1 и содержит константный домен тяжелой цепи 1 (CH1) изотипа IgG2 и шарнирную область;

v. выделенное антитело имеет изотип человеческого или мышинового IgG4 и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU; или

vi. выделенное антитело имеет гибридный изотип IgG2/4.

21. Выделенное антитело по п.20, причем выделенное антитело имеет изотип человеческого или мышинового IgG1 и содержит одну или более аминокислотных замен в Fc-области в положении остатка, выбранного из группы, состоящей из N297A, D265A, L234A, L235A, G237A, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU, и причем Fc-область дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен в положении, выбранном из группы, состоящей из A330L, L234F, L235E, P331S и их любой комбинации, причем нумерация остатков представлена в соответствии с системой нумерации EU.

22. Фрагмент антитела выделенного антитела по любому из пп.1-21, где фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

23. Выделенное биспецифическое антитело, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное биспецифическое антитело включает антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-22.

24. Выделенное мультивалентное антитело, которое связывается с белком TREM2, причем выделенное мультивалентное антитело включает антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-22.

25. Выделенное антитело, фрагмент антитела, биспецифическое антитело или мультивалентное антитело по любому из пп.1-24, причем антитело, фрагмент антитела, биспецифическое антитело или мультивалентное антитело представляет собой моноклональное антитело, фрагмент моноклонального антитела, моноклональное биспецифическое антитело или моноклональное мультивалентное антитело.

26. Фрагмент антитела выделенного антитела по любому из пп.1-21 или фрагмент антитела по п.22, причем фрагмент антитела связывается с одним или более человеческими белками, выбранными из группы, состоящей из человеческого TREM2 дикого типа и встречающегося в природе варианта человеческого TREM2, причем фрагмент антитела является перекрестно-сшитым со вторым фрагментом антитела, который связывается с одним или более человеческими белками, выбранными из группы, состоящей из человеческого TREM2 дикого типа, встречающегося в природе варианта человеческого TREM2, человеческого DAP12 и встречающегося в природе варианта человеческого DAP12.

27. Выделенное биспецифическое антитело по п.23 или 25, причем биспецифическое антитело распознает первый антиген и второй антиген, где первый антиген представляет собой человеческий TREM2 дикого типа или его встречающийся в природе вариант, и второй антиген представляет собой DAP12 или белок, выбранный из группы, состоящей из бета-амилоида или его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, PrPSc, хантинтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида А, медины, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA) и пептидов повтора пролин-аргинин (PR); или белок, специфический по отношению к гематоэнцефалическому барьеру, выбранный из группы, состоящей из: рецептора трансферрина, инсулинового рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста, LRP-1 и LRP1.

28. Выделенное антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-22, отличающиеся тем, что вы-

деленное антитело или фрагмент антитела связывается с одним или более человеческими белками, выбранными из группы, состоящей из человеческого TREM2 дикого типа и встречающегося в природе варианта человеческого TREM2.

29. Выделенное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-28, причем выделенное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или фрагмент антитела специфически связывается как с человеческим TREM2, так и с мышным TREM2.

30. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-21, 25, 28 и 29.

31. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по любому из пп.23, 25, 27 и 29.

32. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мультивалентное антитело по любому из пп.24, 25 и 29.

33. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая фрагмент антитела по любому из пп.22, 25, 26, 28 и 29.

34. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.30-33.

35. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.34.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или фрагмент антитела по любому из пп.1-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

37. Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума с деменцией, лобно-височной деменцией, болезнью Альцгеймера или рассеянным склерозом, включающий стадию, в которой вводят индивидууму терапевтически эффективное количество выделенного антитела, биспецифического антитела, мультивалентного антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-29.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что у индивидуума болезнь Альцгеймера.

39. Способ по п.37 или 38, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены глутаминовой кислоты на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Glu14 из SEQ ID NO: 1;

ii. замены глутамин на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Gln33 из SEQ ID NO: 1;

iii. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp44 из SEQ ID NO: 1;

iv. аминокислотной замены аргинина на гистидин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Arg47 из SEQ ID NO: 1;

v. замены триптофана на стоп-кодон в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотный остаток Trp78 из SEQ ID NO: 1;

vi. аминокислотной замены валина на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Val126 из SEQ ID NO: 1;

vii. аминокислотной замены аспарагиновой кислоты на глицин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Asp134 из SEQ ID NO: 1; и

viii. аминокислотной замены лизина на аспарагин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Lys186 из SEQ ID NO: 1.

40. Способ по п.37 или 38, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант TREM2, причем вариант содержит нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G313 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; нуклеотидную делецию гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G267 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1; или и ту и другую делецию.

41. Способ по п.37 или 38, отличающийся тем, что индивидуум имеет гетерозиготный вариант DAP12, причем вариант содержит один или более вариантов, выбранных из группы, состоящей из:

i. замены метионина на треонин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Met1 из SEQ ID NO: 2;

ii. аминокислотной замены глицина на аргинин в аминокислоте, соответствующей аминокислотному остатку Gly49 из SEQ ID NO: 2;

iii. делеции в пределах экзона 1-4 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2;

iv. вставки из 14 остатков аминокислот в экзоне 3 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2; и

v. нуклеотидной делеции гуанина в нуклеотиде, соответствующем нуклеотидному остатку G141 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 2.

42. Способ по любому из пп.37-41, в котором выделенное антитело, биспецифическое антитело, мультивалентное антитело или фрагмент антитела вводят в сочетании с одним или несколькими антителами, которые специфически связывают белок, выбранный из группы, состоящей из бета-амилоида или

его фрагментов, Тау, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, прионного белка, прионного белка PrPsc, хантингтина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, телец Леви, атриального натрийуретического пептида, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, сывороточного амилоида A, медина, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета-2-микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, продуктов трансляции, ассоциированных с повторами не ATG (RAN), пептидов дипептидного повтора (ДПП), пептидов повтора глицин-аланин (GA), пептидов повтора глицин-пролин (GP), пептидов повтора глицин-аргинин (GR), пептидов повтора пролин-аланин (PA), пептидов повтора пролин-аргинин (PR) и любой их комбинации.

43. Применение выделенного антитела, биспецифического антитела, мультвалентного антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-29 для индукции или стимулирования выживаемости макрофагов или клеток микроглии у нуждающегося в этом индивидуума.

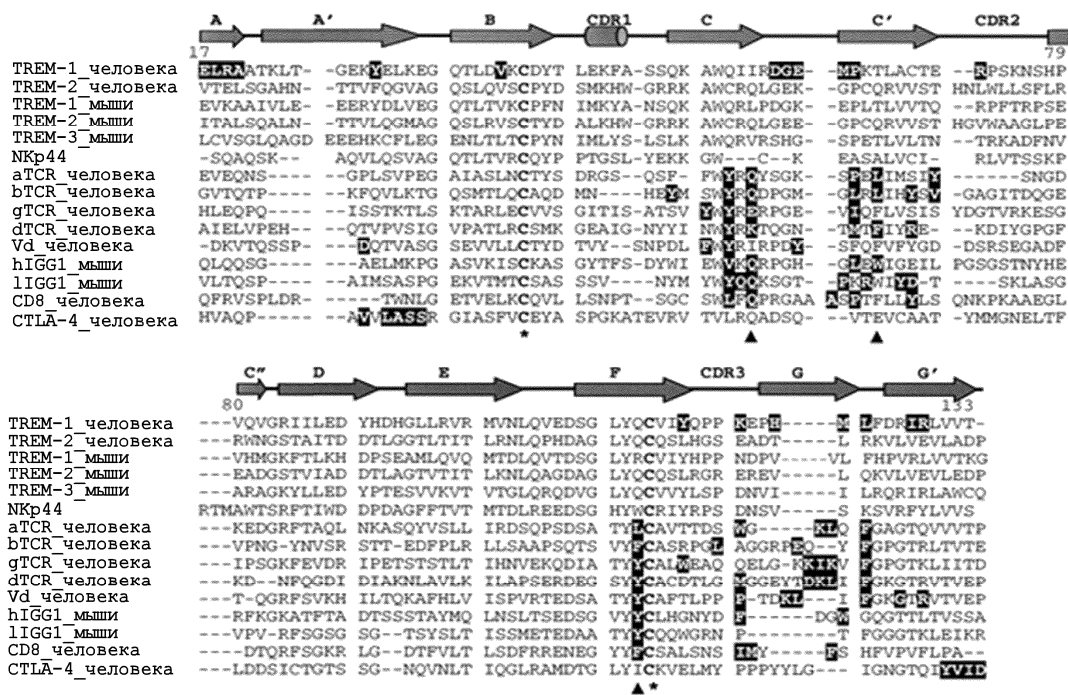
```

1 MEPLRLILLLVTELSGAHNNTTVFQGVAGQSLQVSCPYPDSMKHWGRRKAWCRQLGEGKGPC 60
+ PL LL+LLF ++ V Q VAGQ+L V C Y +K WC++ C
6 LHPLLLLLLLFPQSQAQS-KAQLVQSVAGQTLTVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASAL-VC 63

61 QRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADT 120
R+V++ ++ W I DD G T+T+ +L+ D+G Y C+ S+
64 IRLVTSKPRPTMA----WTSRFTIWDPPDAGFFVTMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSV 119

121 LRKVLVEVLADP 132 TREM-2 человека
+ V ++ P
120 SKSVRFYLVVSP 131 NCTR2 человека
    
```

Фиг. 1A



Фиг. 1B

sp|Q9NZC2|TREM2_ЧЕЛОВЕК Триггерный рецептор, который экспрессируется на миелоидных клетках 2
OS=Homo sapiens GN=TREM2 PE=1 SV=1
ID последовательности: |c|35715 Длина: 230 Количество совпадений: 1
Диапазон 1: от 6 до 110

| Счет | Expect | Способ | Идентичности | Позитив. | Пробелы | Рамка |
|---------------------|---------|--|--------------|-------------|-----------|-------|
| 42.7 бит (99) | 1e-09() | Регулировка композиционной матрицы | 34/107(32%) | 49/107(45%) | 4/107(3%) | |
| Особенности: | | | | | | |
| TREM1 | 9 | LLWMLFVSELRAATKLTTEEKYLKEGQTLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEGKGPC | 66 | | | |
| TREM2 | 6 | LLILLFVTELSGAHNNTTVFQGVAGQSLQVSCPYPDSMKHWGRRKAWCRQLGEGKGPCRV | 63 | | | |
| TREM1 | 67 | LACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQC | 113 | | | |
| TREM2 | 64 | VSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTTLTITLRNLQPHDAGLYQC | 110 | | | |

Фиг. 2A

Ab21
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWNGIHPGSDTRYSPSFQGVVTSADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC
 ARAGHYDGGHLGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:414)

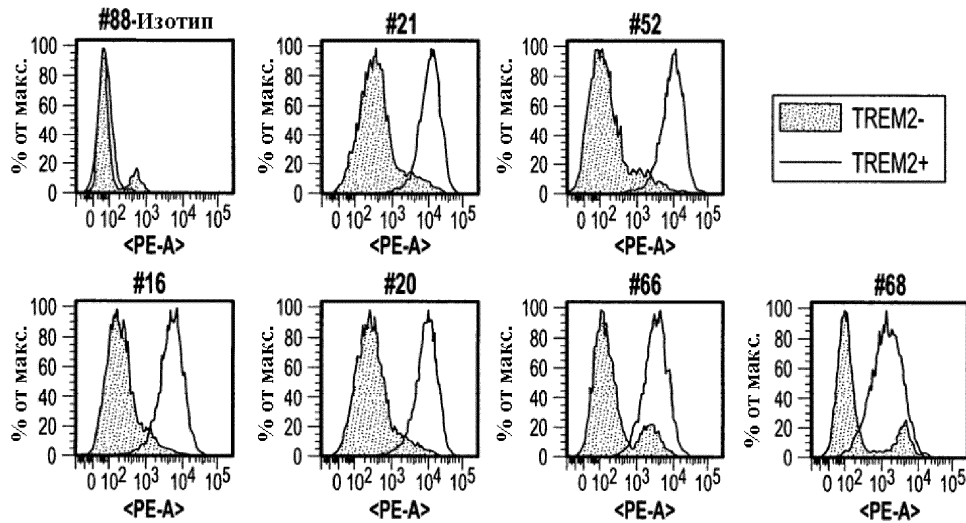
Ab52
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWNGIINPSSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVY
 CAREADSSGYPLGLDYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:415)

Фиг. 2B

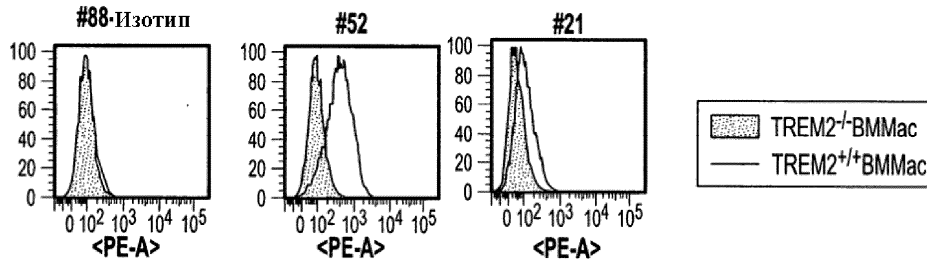
Ab21
 EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQDDSDAPYTF
 GGGTKVEIK (SEQ ID NO:416)

Ab52
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQVNSLPPTFG
 GGTKVEIK (SEQ ID NO:417)

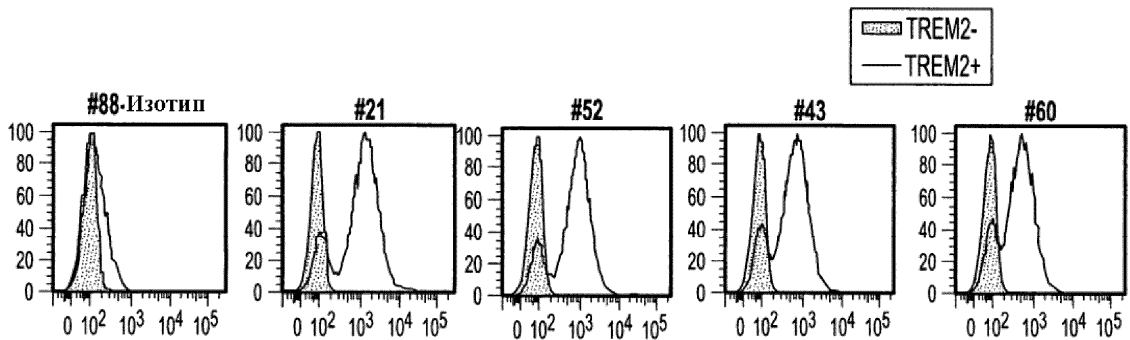
Фиг. 2C



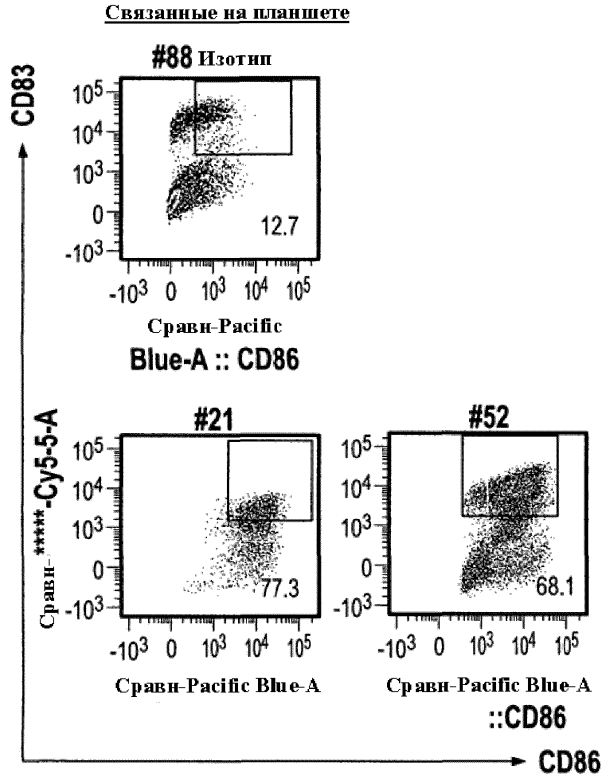
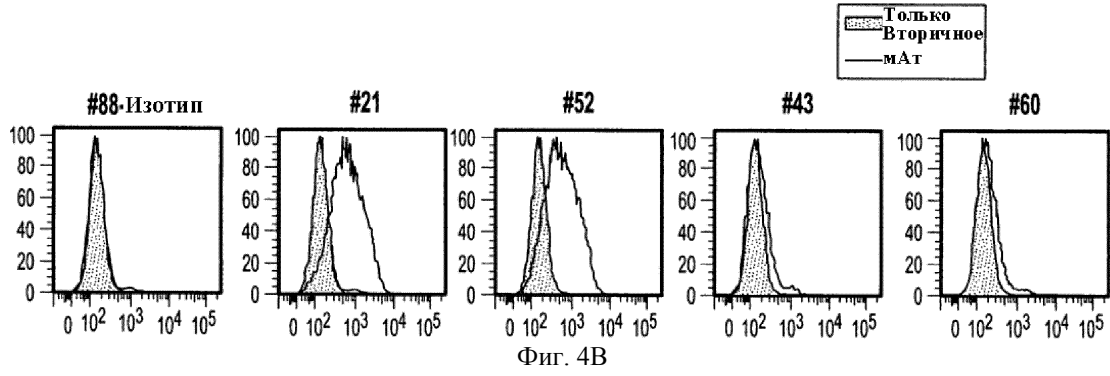
Фиг. 3A

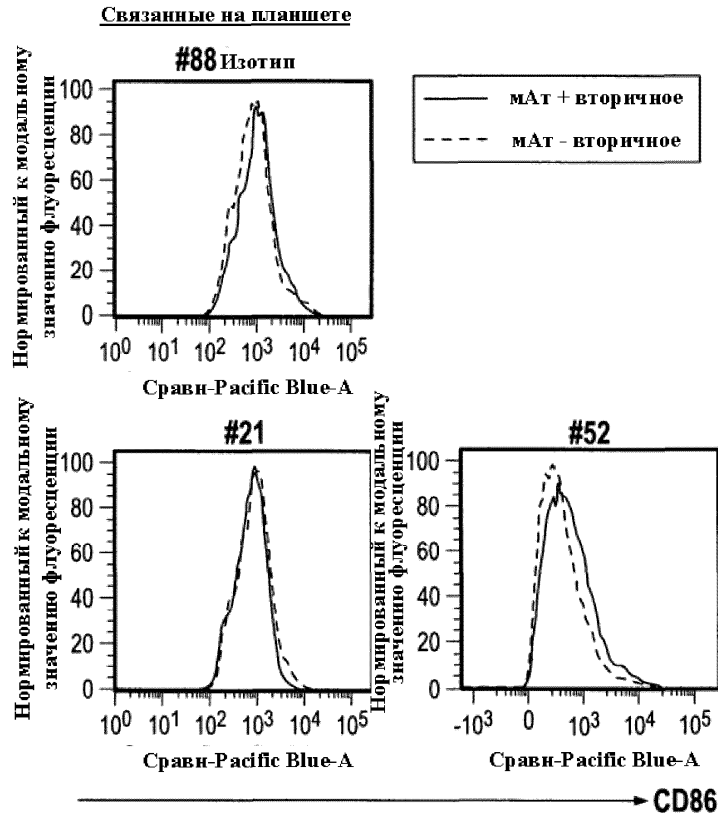


Фиг. 3B

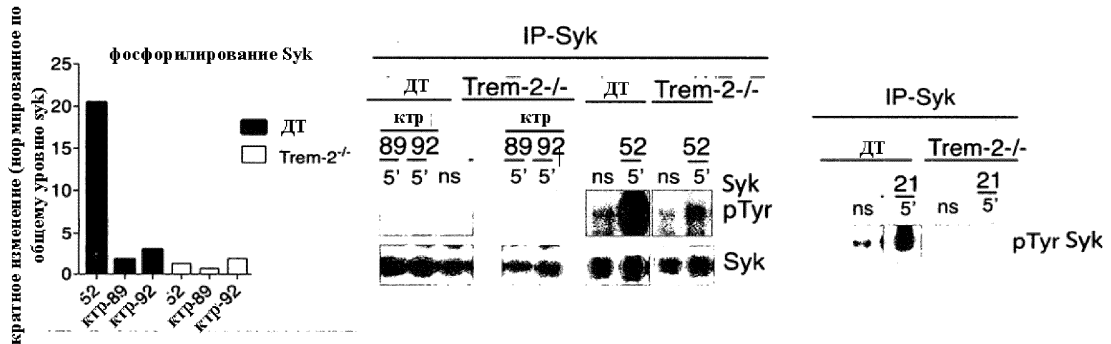


Фиг. 4A

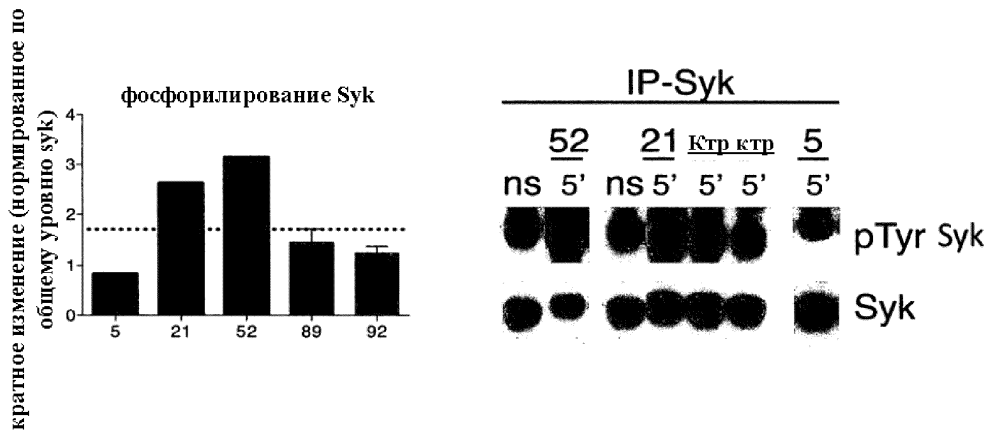




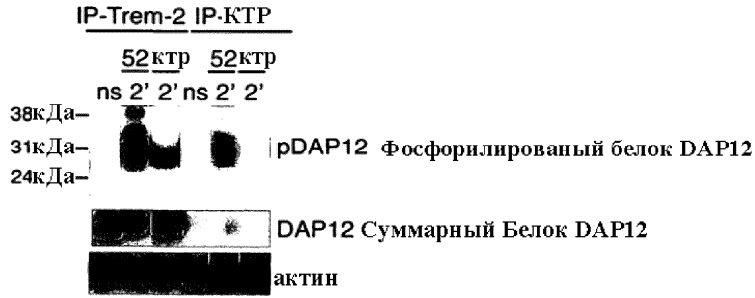
Фиг. 5В



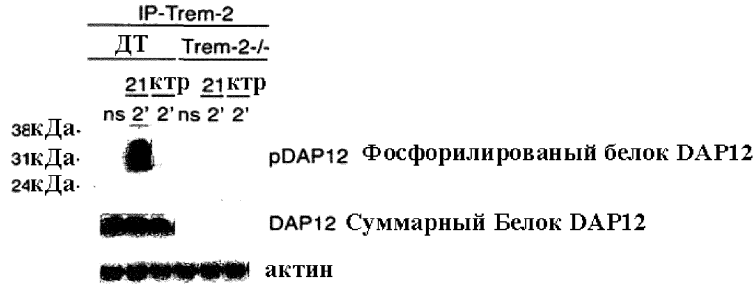
Фиг. 6А



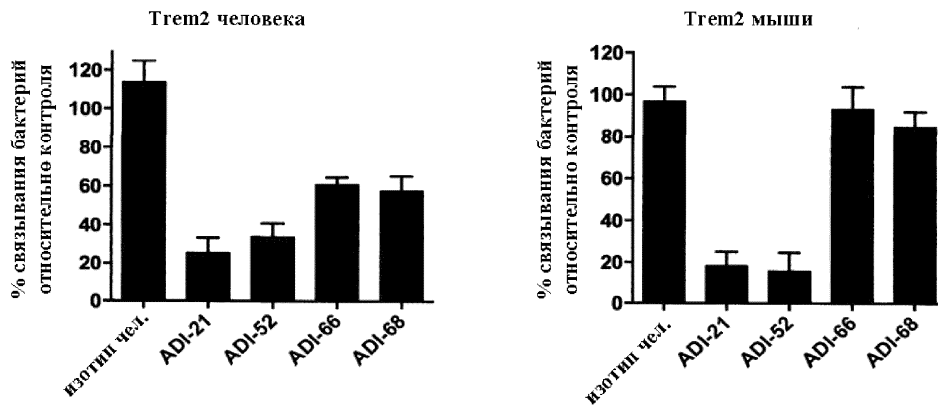
Фиг. 6В



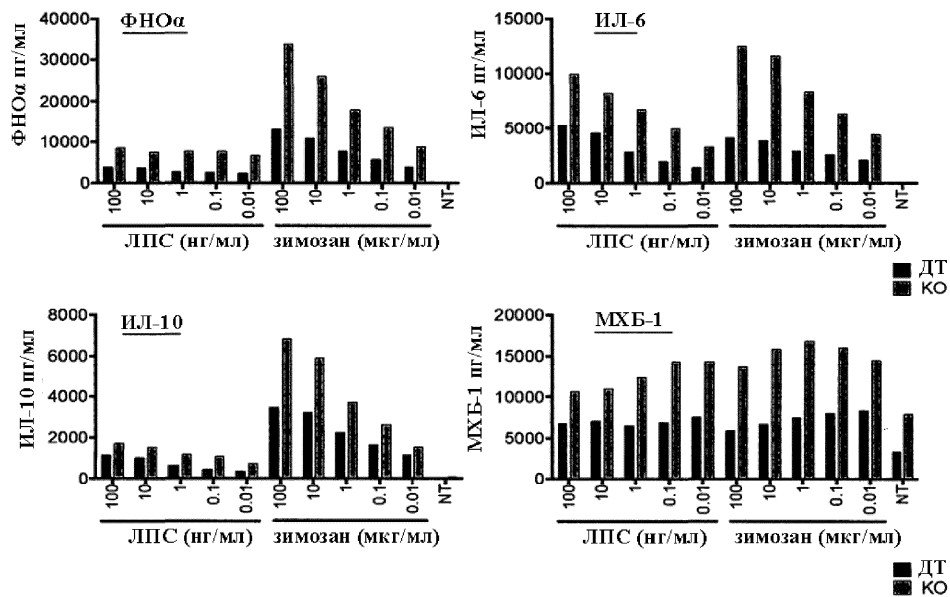
Фиг. 7А



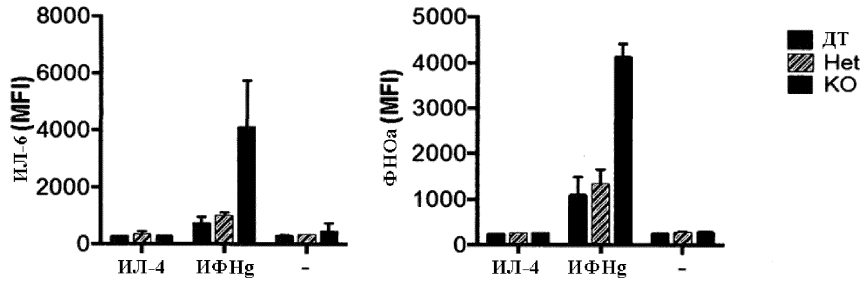
Фиг. 7В



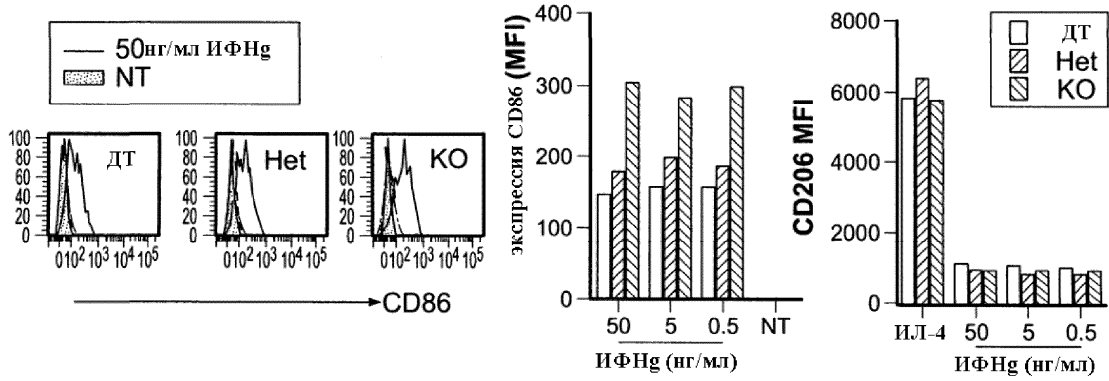
Фиг. 8



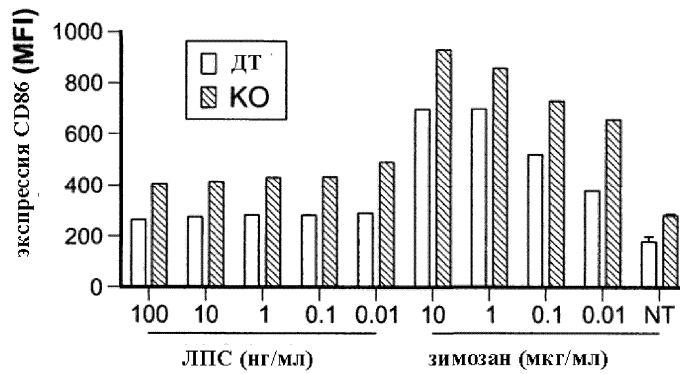
Фиг. 9А



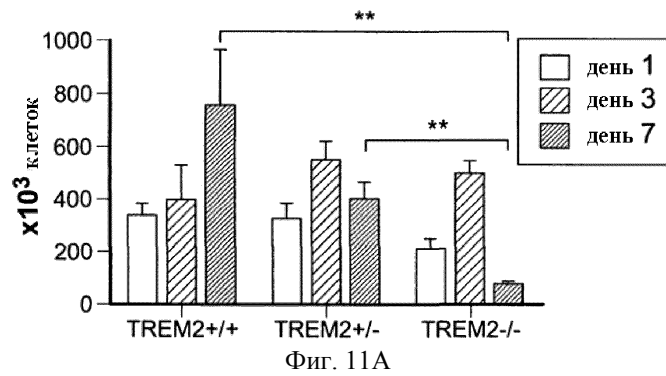
Фиг. 9В



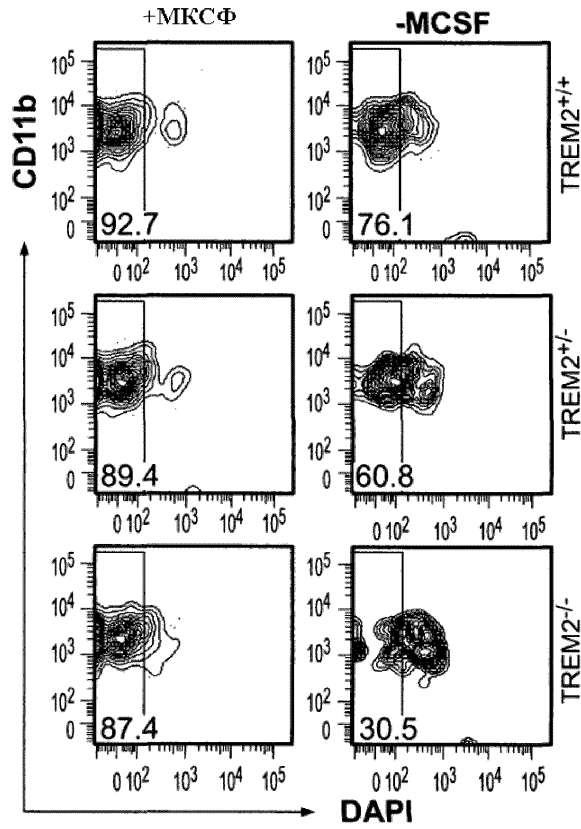
Фиг. 10А



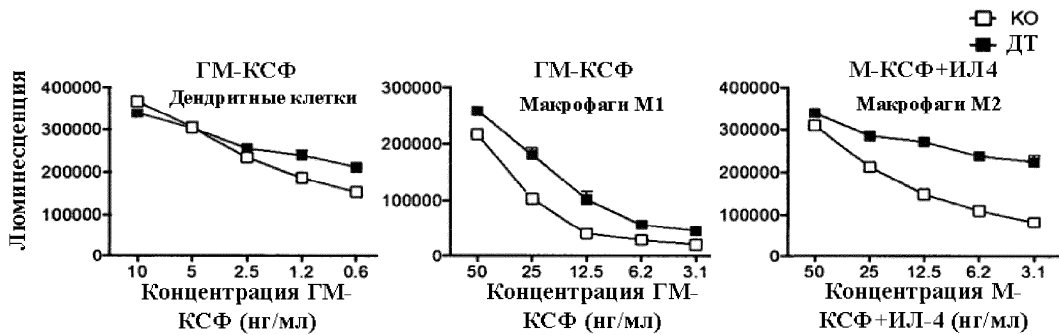
Фиг. 10В



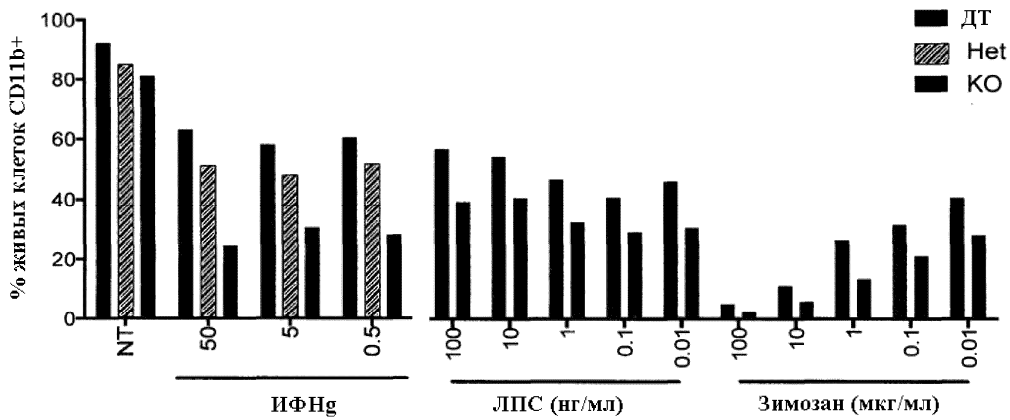
Фиг. 11А



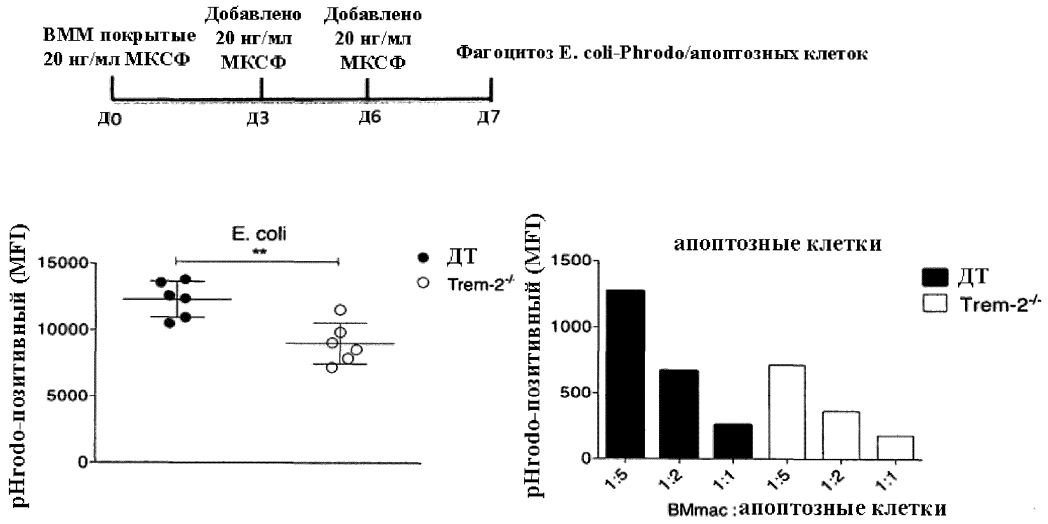
Фиг. 11В



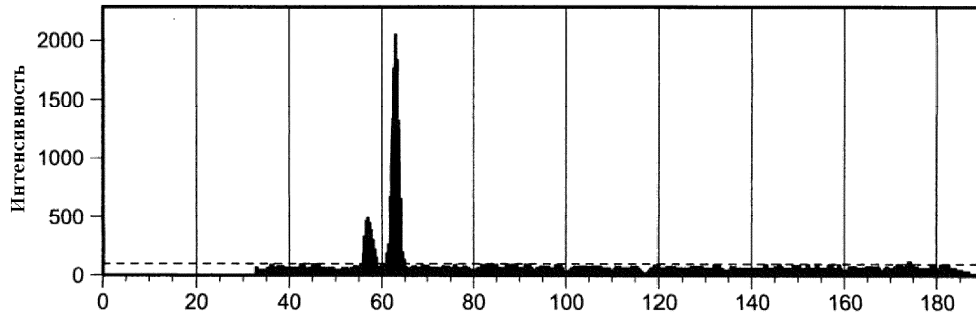
Фиг. 11С



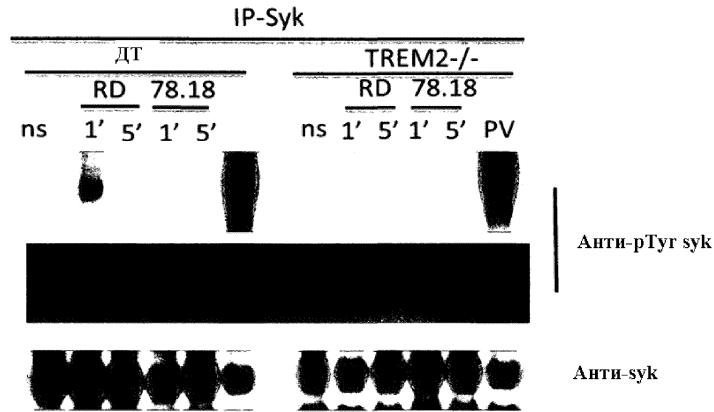
Фиг. 11D



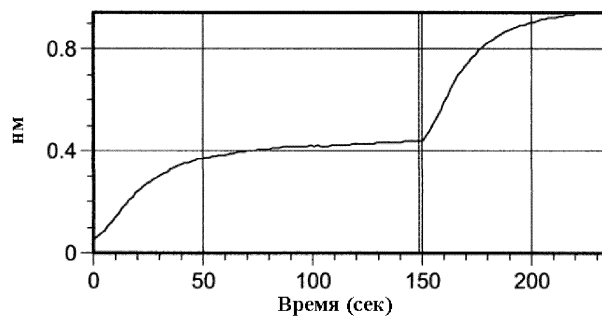
Фиг. 12



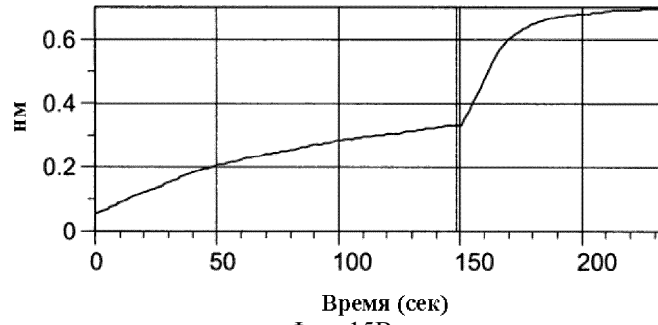
Фиг. 13



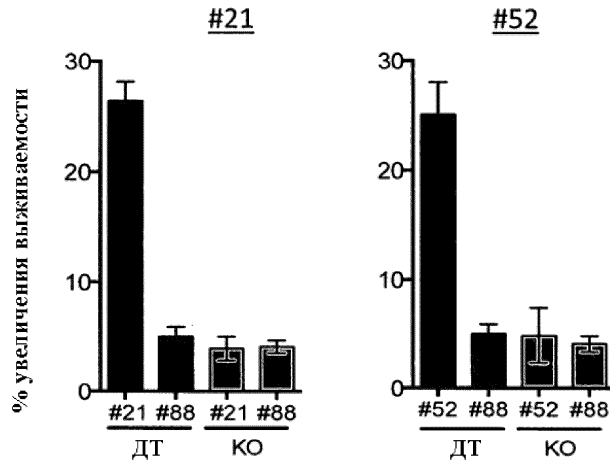
Фиг. 14



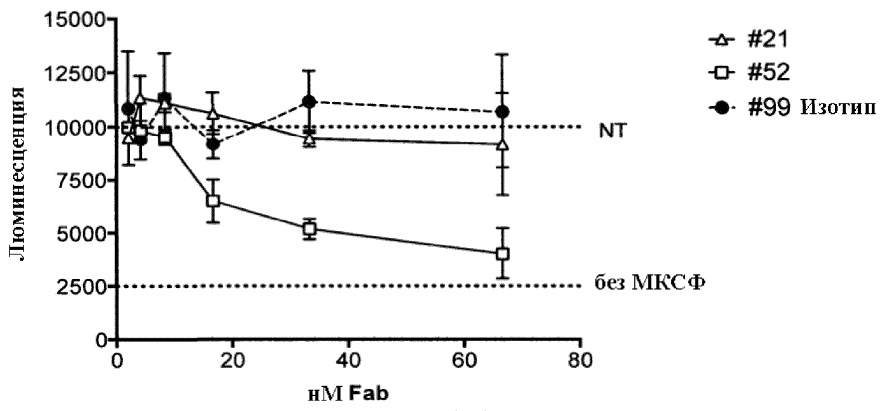
Фиг. 15А



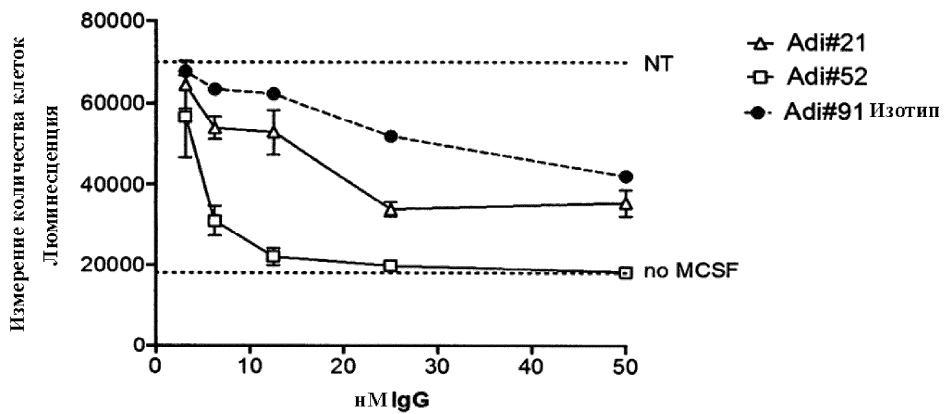
Фиг. 15В



Фиг. 16

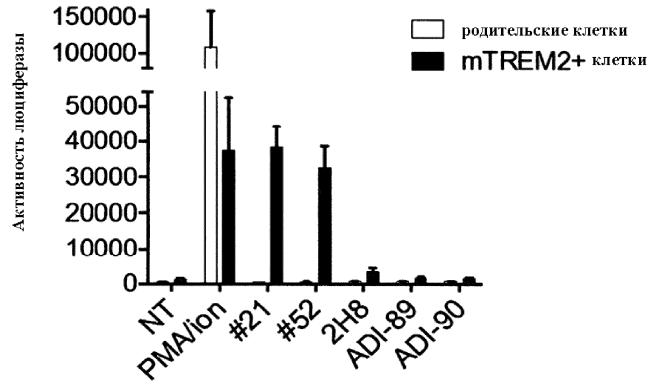


Фиг. 17А

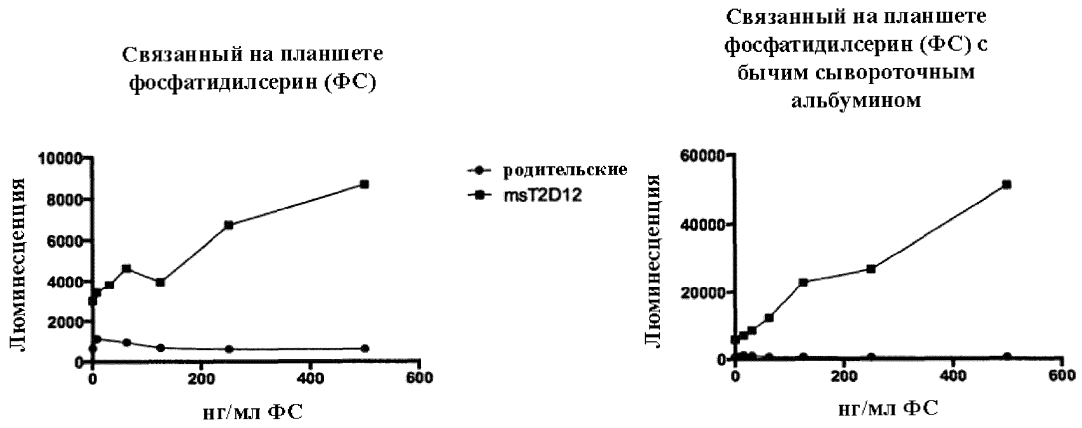


Полноразмерные антитела в растворе

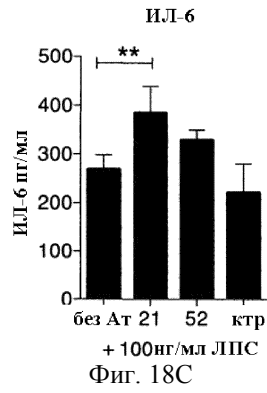
Фиг. 17В



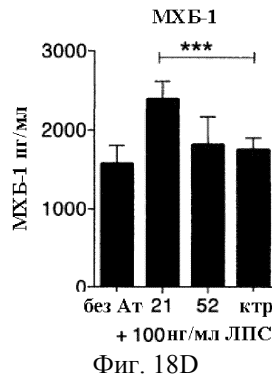
Фиг. 18А



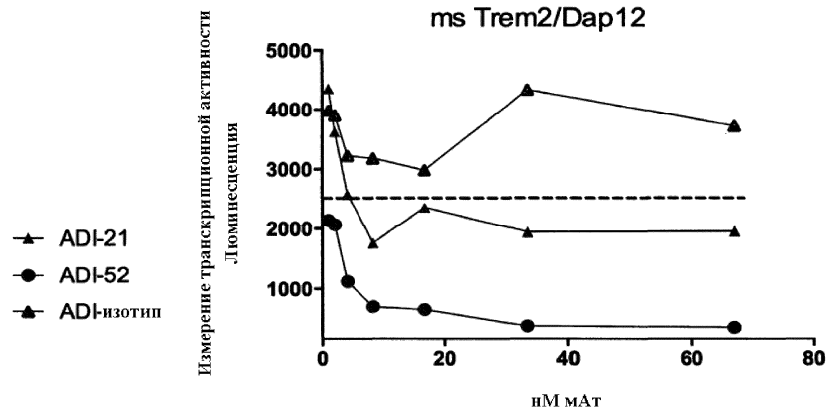
Фиг. 18В



Фиг. 18С



Фиг. 18D



Полноразмерные антитела в растворе

Фиг. 19

At1 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:242)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGKGLEWVSVISGGSTYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTPTLLFQH
WGQGITLVTVSS

At2 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:244)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS~~WVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVPDYDYS
GYSNYYYMDVWGKGTITVTVSS

At3 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:246)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSY~~AISWVRQAPGQGLEWMGGHPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST~~STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREQYHVGMD
YWGKGTITVTVSS

At4 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:248)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSY~~AISWVRQAPGQGLEWMGGHPIFGTASYAQKFQGRVTITADEST~~STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVDSIMDYW
GQGITLVTVSS

At5 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:250)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTF~~TSYYIH~~WVRQAPGQGLEWMGI~~INP~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LSLRSEDTAVYYCARAPQESPYV~~
FDI~~WGQGITVTVSS~~

At6 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:252)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTF~~TSYYMH~~WVRQAPGQGLEWMGI~~INP~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LSLRSEDTAVYYCARGSPYGY~~
LYDPWGQGITLVTVSS

At7 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:254)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTF~~TSYYMH~~WVRQAPGQGLEWMGI~~INP~~SGGSTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LSLRSEDTAVYYCARTSSKERD~~
YWGQGITLVTVSS

At8 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:256)

QLQLQESGGLV~~KPSETLSL~~TCTVSGGSISSSYYWG~~WIRQPPGKLEWIGSISYSGSTYYNPSLKS~~RVTVSDT~~SKNQFSLK~~LSSVTAADTAVYYCARGPYRLLLGMD
YWGQGITVTVSS

At9 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:258)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY~~SFTSYWIG~~WVRQMPGKGLEWMGI~~IYPGDS~~DTYSPSFQGV~~TISADKSISTAYLQWSSLKASDT~~AMY~~YCARLHISGEVNW~~
FDPWGQGITLVTVSS

At10 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:260)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGY~~SFTSNWIG~~WVRQMPGKGLEWMGI~~IYPGDS~~DTYSPSFQGV~~TISADKSISTAYLQWSSLKASDT~~AMY~~YCAR~~EAGYDYGEL
AFDIWGQGITVTVSS

- At11 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:262)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGSDTRYSPSQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARAGHYDGGHGLGMDYWGQGITVTVSS
- At12 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:264)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGSDTRYSPSQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLGHYSGTVSSYGM DYWGQGITVTVSS
- At13 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:266)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGGKLEWMGWISAYNGNTNYAQKLGQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGPSHYDGLA WGQGITVTVSS
- At14 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:268)
QVQLQESGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWWRQHPGKLEWIGNIYSGSTVYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGLYGYGLVDVWGGTMTVTVSS
- At15 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:268)
QVQLQESGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWWRQHPGKLEWIGNIYSGSTVYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGLYGYGLVDVWGGTMTVTVSS
- At16 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:271)
QLQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNSYYWWRQPPGKLEWIGSIYSGSTYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGLVGYGVFDYWGQGITVTVSS
- At17 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:271)
QLQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNSYYWWRQPPGKLEWIGSIYSGSTYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGLVGYGVFDYWGQGITVTVSS
- At18 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:274)
QVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWWRQPPGKLEWIGSIYSGSTYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGGGGEYPSGTPFDI WGGTMTVTVSS
- At19 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:274)
QVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWWRQPPGKLEWIGSIYSGSTYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGGGGEYPSGTPFDI WGGTMTVTVSS
- At20 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:277)
QVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWWRQPPGKLEWIGSIYSGSTYVNSPKLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSGMASFFDYWGGTMTVTVSS
- At22 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:262)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGSDTRYSPSQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARAGHYDGGHGLGMDYWGQGITVTVSS
- At23 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:280)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLGGHSMVDVWGGTITVTVSS
- At24 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:282)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPLKRGGRGFYWGQGITVTVSS
- At25 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:284)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGRITITMDWGGTITVTVSS
- At26 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:286)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDOYSVLDYWGQGITVTVSS
- At27 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:288)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKYSSRGVYFDYWGQGITVTVSS
- At28 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:290)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGAVGARHVTYFDYWGQGITVTVSS
- At29 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:292)
QVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGQYYGGSGWFDPPWGQGITVTVSS
- At30 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:294)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGOEYAYFQHWGGGITVTVSS

- At31 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:296)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRRDGYDEVE
DIWGQGTMTVSS
- At32 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:298)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVPKHVYVLDY
WGGTLVTVSS
- At33 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:300)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGGHLEFDY
WGGTLVTVSS
- At34 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:302)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGYVDFE
DIWGQGTMTVSS
- At35 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:304)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRSGYGASNYE
YWGQGTMTVTVSS
- At36 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:306)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGAAASPA
EDIWGQGTMTVTVSS
- At37 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:308)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGYMLGMDV
WGGTITVTVSS
- At38 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:310)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPVDYGGIE
PEYFQHWGQGTMTVTVSS
- At39 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:312)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHYHVGIAFDI
WGGTMTVTVSS
- At40 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:304)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRSGYGASNYE
YWGQGTMTVTVSS
- At41 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:315)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAMARKSVAFDI
WGGTMTVTVSS
- At42 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:317)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVPYQRTAFD
WGGTMTVTVSS
- At43 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:319)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPAVAGIYR
ADYWGQGTMTVTVSS
- At44 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:306)
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGAAASPA
EDIWGQGTMTVTVSS
- At45 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:322)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGPGY
TALDY
YMDYWGKGTITVTVSS
- At46 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:324)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARPAK
TADYWGQ
GTLVTVSS
- At47 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:326)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARP
GKSMVWVGQ
GTTVTVSS
- At48 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:326)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARP
GKSMVWVGQ
GTTVTVSS
- At49 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:324)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARP
AKTADYWGQ
GTLVTVSS
- At50 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:250)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFISYMHVWVRQAPGQGLEWGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARAP
QESPYVFDI
WGGTMTVTVSS

At51 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:331)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGII~~NP~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LS~~SLRSED~~TA~~VYYCARGVGGQDY~~YYM~~
DYWGKGTIVTVSS

At53 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:250)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~YIH~~WVRQAPGQGLEWMGII~~NP~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LS~~SLRSED~~TA~~VYYCARAPQESPYVFDI~~W~~
GQGTMTVTVSS

At54 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:322)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGII~~NP~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LS~~SLRSED~~TA~~VYYCARGPGYTTALDY~~Y~~
YMDYWGKGTIVTVSS

At55 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:335)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGSY~~MH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARGPLYHPMIFD~~Y~~
YWGQGTIVTVSS

At56 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:337)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGSI~~NP~~NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARASSVDNWGQ~~Y~~
GTLVTVSS

At57 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:339)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITNY~~GIS~~WVRQAPGQGLEWMGWI~~SAY~~NGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARGPTKAYYGS~~Y~~
GSYVFDIPWGQGTIVTVSS

At58 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:341)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI~~IYP~~GDSDTRYSPSFQGVQVTSADKSISTAYLQWSS~~LK~~ASDTAMYYCARLGIYSTGATAFDI~~Y~~
WGQGTMTVTVSS

At59 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:343)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGSY~~MH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARGGVWYSLFD~~Y~~
I~~W~~GQGTMTVTVSS

At60 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:345)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARASKMGDDW~~Y~~
GQGTIVTVSS

At61 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:347)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~GIH~~WVRQAPGQGLEWMGWI~~SAY~~NGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARGGVPRVSYFQ~~Y~~
HWGQGTIVTVSS

At62 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:349)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI~~IYP~~GDSDTRYSPSFQGVQVTSADKSISTAYLQWSS~~LK~~ASDTAMYYCARAGHYDDWSGLGL~~Y~~
D~~Y~~WGQGTMTVTVSS

At63 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:351)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~GIS~~WVRQAPGQGLEWMGWIS~~T~~YNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARGSGSGYDSWY~~Y~~
D~~Y~~WGQGTIVTVSS

At64 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:353)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI~~IYP~~GDSDTRYSPSFQGVQVTSADKSISTAYLQWSS~~LK~~ASDTAMYYCARLGRWSSGSTAFDI~~Y~~
WGQGTMTVTVSS

At65 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:355)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI~~IYP~~GDSDTRYSPSFQGVQVTSADKSISTAYLQWSS~~LK~~ASDTAMYYCARLGRKPSGSVAFDI~~Y~~
WGQGTMTVTVSS

At66 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:357)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGSY~~MH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARAGHKTHDY~~Y~~
WGQGTIVTVSS

At67 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:326)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITSY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGII~~NP~~SGGSTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME~~LS~~SLRSED~~TA~~VYYCARPGKSMIDVWGQ~~Y~~
GTTVTVSS

At68 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:360)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY~~GMH~~WVRQAPGKGLEWVALI~~WY~~DGSKNYADSVKGRFTISRDN~~SK~~NTLYLQMN~~SL~~RAED~~TA~~VYYCAKPGSMIDYWG~~Y~~
QGTIVTVSS

At69 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:362)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGSY~~MH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARAKSV~~DH~~DY~~Y~~
GQGTIVTVSS

At70 - Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:345)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITGY~~YMH~~WVRQAPGQGLEWMGWIN~~PN~~SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME~~LS~~RLRSD~~TA~~VYYCARASKMGDDW~~Y~~
GQGTIVTVSS

- At71 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:365)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQAPGQGLEWMGHNPNSSGGSTSYAQKFKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDISTHSDYDLAF
DIWGGQTMVTVSS
- At72 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:367)
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSGTETLFDYWGQGLTV
TVSS
- At73 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:369)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQMPGKLEWGMGIHPGSDDTYSPSQGVVVISADKSIATYLQWSSLKASDTAMYYCARAKMLDDGYAFDI
WGGQTMVTVSS
- At74 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:357)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFKQGRVTMTRDTSTISATYMELSRLRSDDTAVYYCARAGHKTHDY
WGGQGLTVTVSS
- At75 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:372)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQAPGQGLEWGMWINPNSSGGTNYAQKFKQGRVTMTRDTSTISATYMELSRLRSDDTAVYYCARDLGYSSLLA
LDIWGGQTMVTVSS
- At76 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:374)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMHWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRRGDNNWFD
PWGGQGLTVTVSS
- At77 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:376)
QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPPHEMDYWG
QGILTVTVSS
- At78 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:378)
QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIPYPWIYFDL
WGRGTLTVTVSS
- At79 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:380)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMHWVRQAPGKGLEWVSYISGSSSTIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRRHYGGMDV
WGGQGLTVTVSS
- At80 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:382)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGGTFWGSWAL
YWGQGLTVTVSS
- At81 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:384)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDSGNYDYWSGAL
RYWGQGLTVTVSS
- At82 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:386)
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYSGSTVYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVSSSWYKAWGGQ
TMVTVSS
- At83 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:388)
QVQLQQWAGLLKPSSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGIEDHSGSTKYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVGVVGRPGYSAFD
IWGGQTMVTVSS
- At84 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:351)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYNGNTNYAQKFKQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSGSGYDSWY
DWGGQGLTVTVSS
- At85 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:391)
QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGGYYGGA
AYGMDYWGQGLTVTVSS
- At86 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:393)
QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGYYGLGNW
FDPWGGQGLTVTVSS
- At87 - Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:395)
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGSIYYSGSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHGWDVRVGFDPWGG
GTLTVTVSS

Фиг. 20А

At1 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:243)
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQLPYWPPTFGGGTKVEIK

At2 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:245)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYFFYPPTFGGGTKVEIK

At3 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:247)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLAIGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQPFNFPYIFGGGKVEIK

At4 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:249)
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYASSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDHDYPTFGGGTKVEIK

At5 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:251)
EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQYFSSPPTFGGGTKVEIK

At6 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:253)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQRVNLPTFGGGTKVEIK

At7 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:255)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQRISYPIIFGGGKVEIK

At8 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:257)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQIDDPTIFGGGKVEIK

At9 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:259)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQFSYWPWIFGGGKVEIK

At10 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:261)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQHDSPPPTFGGGTKVEIK

At11 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:263)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQDYSYPWIFGGGKVEIK

At12 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:265)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQEYAVPYIFGGGKVEIK

At13 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:267)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQVSNYPIIFGGGKVEIK

At14 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:269)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQVDNIPPTFGGGKVEIK

At15 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:270)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQFDYPTIFGGGKVEIK

At16 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:272)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQFLNPTIFGGGKVEIK

At17 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:273)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQFFNPTIFGGGKVEIK

At18 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:275)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQFDLPTIFGGGKVEIK

At19 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:276)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQYYDLPTIFGGGKVEIK

At20 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:278)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQFSSHPPTFGGGTKVEIK

At22 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:279)
EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQDRSPYIFGGGKVEIK

At23 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:281)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQKPGQPPKLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEADVAVYYCQQAYLPIIFGGGKVEIK

At24 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:283)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQAFSPPPWFPGGGKVEIK

At25 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:285)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQDRSPYIFGGGKVEIK

At26 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:287)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQEFDLPTIFGGGKVEIK

At27 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:289)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNFPPTFGGGKVEIK

At28 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:291)
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQRYLPTIFGGGKVEIK

At29 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:293)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQQPQAVPTFGGGKVEIK

At30 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:295)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQVYIPTIFGGGKVEIK

- At31 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:297)
DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQDISNFLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYDASNLETGVP~~SR~~FSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQPVLDLPTFGGGTKVEIK
- At32 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:299)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQY~~SFF~~PPTFGGGTKVEIK
- At33 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:301)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QSS~~FPTFGGGTKVEIK
- At34 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:303)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QSD~~FPWF~~FGGGTKVEIK~~
- At35 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:305)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QYS~~API~~IFGGG~~TKVEIK
- At36 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:307)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QLD~~WPTFGGGTKVEIK
- At37 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:309)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QRA~~FLFI~~IFGGG~~TKVEIK
- At38 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:311)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QID~~FLPY~~IFGGG~~TKVEIK
- At39 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:313)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QY~~SPPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At40 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:314)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QYA~~API~~IFGGG~~TKVEIK
- At41 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:316)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFVYYCQ~~QRY~~ALPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At42 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:318)
EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QY~~ASPPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At43 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:320)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QY~~STPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At44 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:321)
EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDSSNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QLV~~HVWPTFGGGTKVEIK
- At45 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:323)
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQ~~QLD~~DWTF~~FGGGTKVEIK~~
- At46 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:325)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDSSNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QRS~~SNYPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At47 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:327)
EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QR~~ILYPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At48 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:328)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QRA~~AYPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At49 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:329)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QRT~~SHPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At50 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:330)
EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QY~~AGSP~~IFGGG~~TKVEIK
- At51 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:332)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QF~~DDVFI~~IFGGG~~TKVEIK
- At53 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:333)
EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QY~~VNSP~~IFGGG~~TKVEIK
- At54 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:334)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLN~~WY~~QKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~QSD~~DDPFI~~IFGGG~~TKVEIK
- At55 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:336)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QL~~STYPLI~~IFGGG~~TKVEIK
- At56 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:338)
EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QRS~~VYPI~~IFGGG~~TKVEIK
- At57 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:340)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QV~~SLEPLI~~IFGGG~~TKVEIK
- At58 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:342)
DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLA~~WY~~QKPKGAPKLLIYDASSLES~~G~~VPSRFSGSGTDFTLTISSLQPDFAVYYC~~LD~~YNSYSP~~IFGGG~~TKVEIK
- At59 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:344)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQDISN~~FLN~~WYQKPKGAPKLLIYDASNLETGVP~~SR~~FSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQ~~QH~~IALLPPTFGGGTKVEIK
- At60 - Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO:346)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA~~WY~~QKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ~~QR~~ASMP~~IFGGG~~TKVEIK

At61 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:348)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDSSNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQAFNRPPTFGGGTKVEIK

At62 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:350)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQSSVHPYTFGGGKVEIK

At63 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:352)
DIQMTQSPSSVASVGDVVTITCRASQGISWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAASLPTFGGGKVEIK

At64 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:354)
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQODDDGYTFGGGKVEIK

At65 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:356)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQODYSWPYTFGGGKVEIK

At66 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:358)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSAYPITFGGGKVEIK

At67 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:359)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSHFPIITFGGGKVEIK

At68 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:361)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRANYPIITFGGGKVEIK

At69 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:363)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRADYPIITFGGGKVEIK

At70 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:364)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSVYPIITFGGGKVEIK

At71 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:366)
EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASNRAATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQAAGSHPTFGGGKVEIK

At72 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:368)
DIQMTQSPSSLASVGDVVTITCRASQDITNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLEITGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDIATYYCQQDVNYPIITFGGGKVEIK

At73 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:370)
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQODDNYPIITFGGGKVEIK

At74 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:371)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSTFPIITFGGGKVEIK

At75 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:373)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQVSNYPIITFGGGKVEIK

At76 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:375)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYHDAPITFGGGTKVEIK

At77 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:377)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQAAYVVPITFGGGTKVEIK

At78 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:379)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQADNWPPIITFGGGKVEIK

At79 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:381)
DIVMTQSPSPLSPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSHRASGVPDRFSGSGSGIDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALESPIITFGGGTKVEIK

At80 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:383)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQYVNWPIITFGGGKVEIK

At81 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:385)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPPIITFGGGKVEIK

At82 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:387)
DIQMTQSPSSVASVGDVVTITCRASQGISWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAISTFPIITFGGGKVEIK

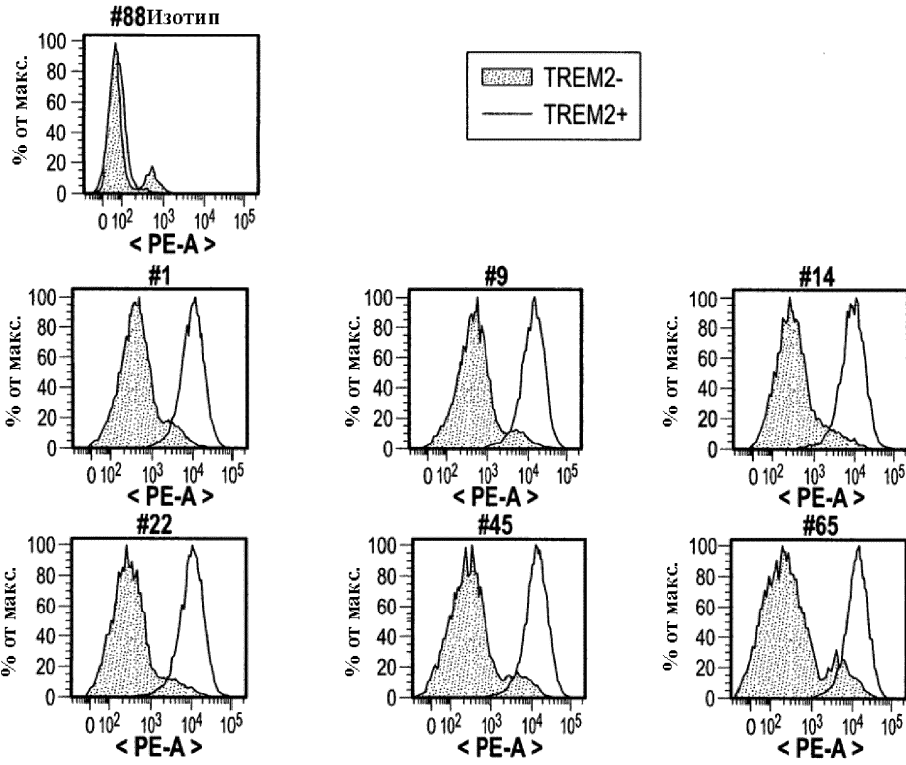
At83 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:389)
DIQMTQSPSSVASVGDVVTITCRASQGISWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQRNSLPLITFGGGKVEIK

At84 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:390)
DIQMTQSPSSLASVGDVVTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYDFPIITFGGGKVEIK

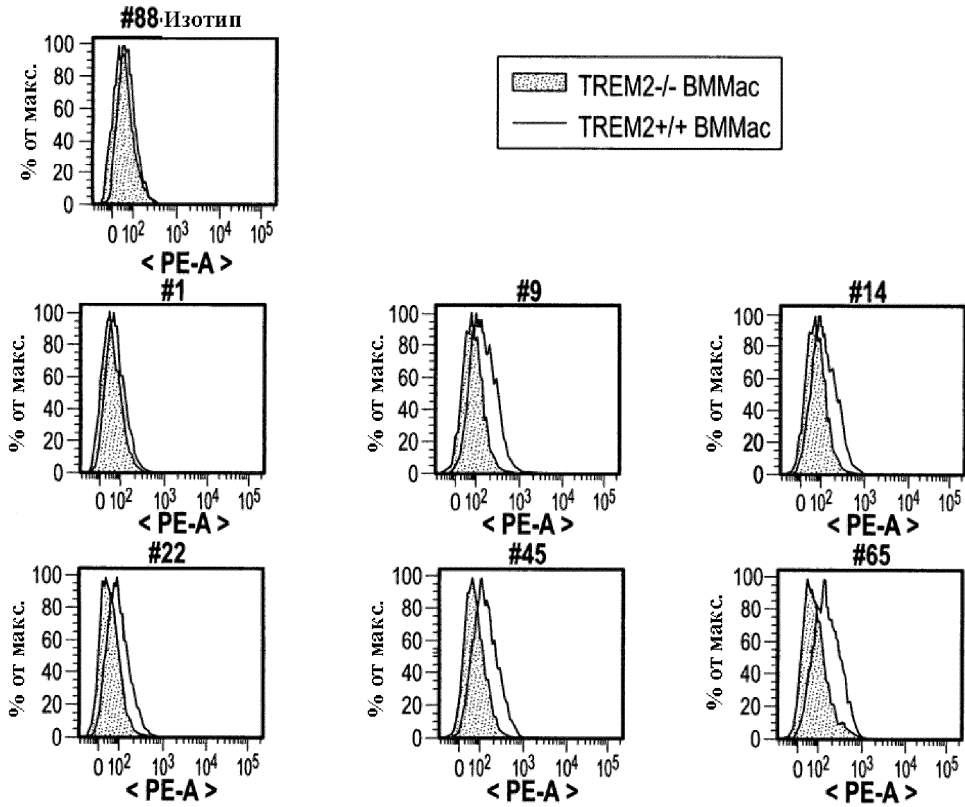
At85 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:392)
DIQMTQSPSSVASVGDVVTITCRASQDISWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQEVDPYPIITFGGGKVEIK

At86 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:394)
DIQMTQSPSTLASVGDVVTITCRASQSISSWLAWYQKPGKAPKLLIYKASLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAVYYCQQLNSYSPITFGGGKVEIK

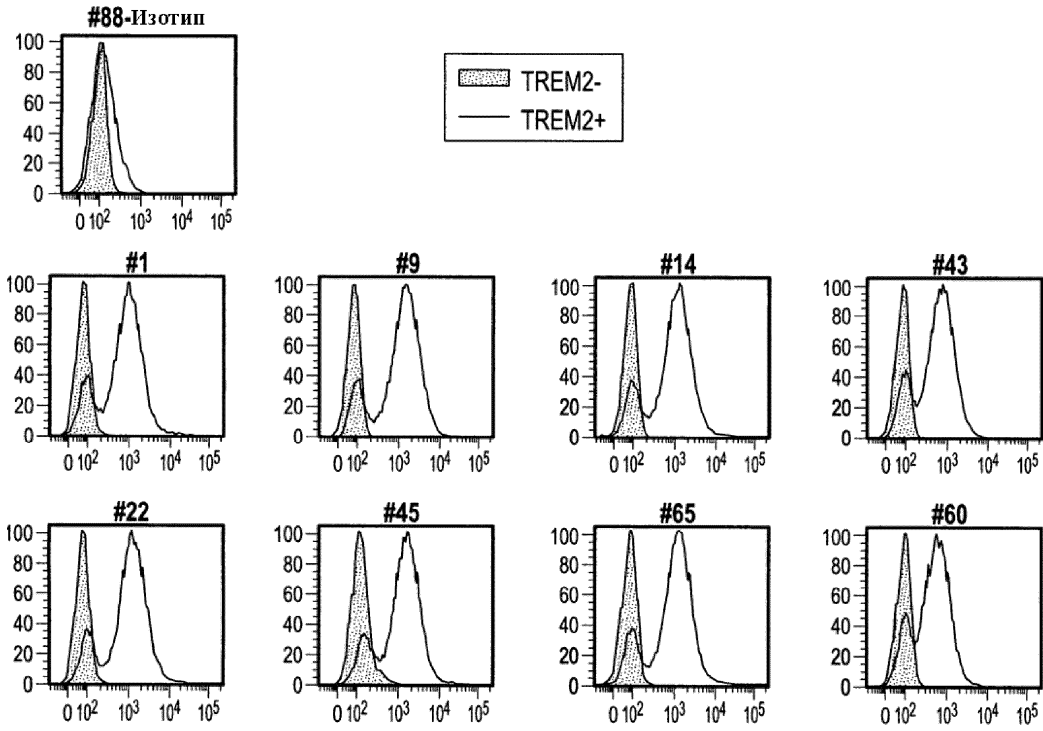
At87 - Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:396)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQYIFWPPIITFGGGKVEIK



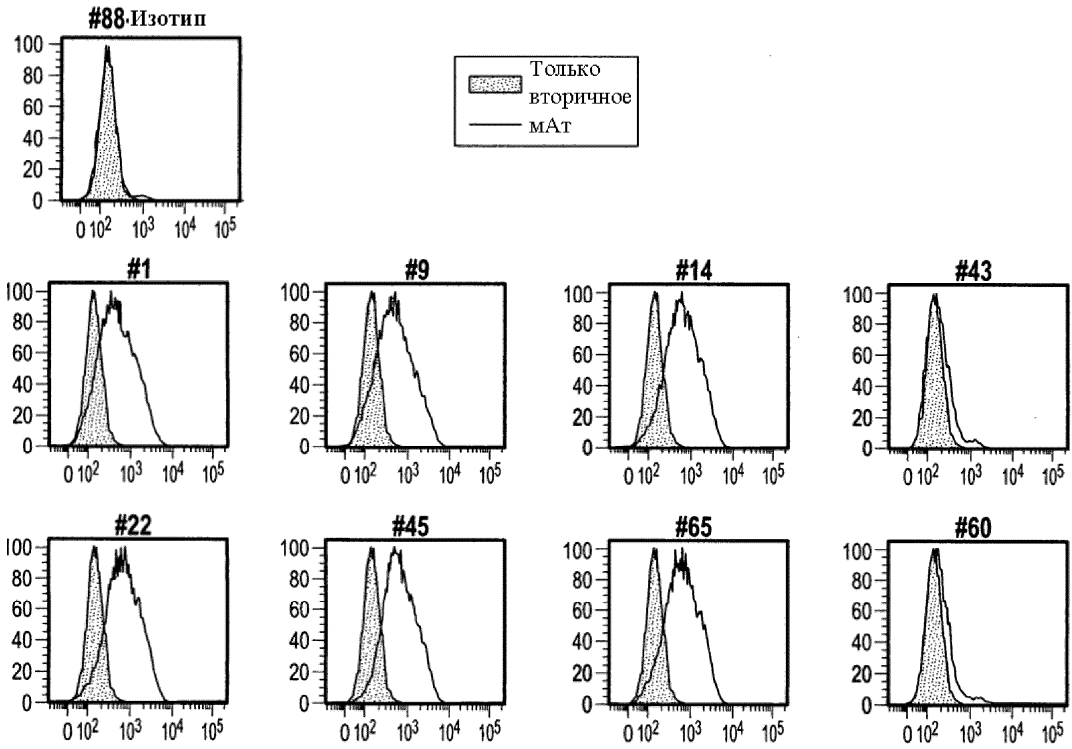
Фиг. 21А



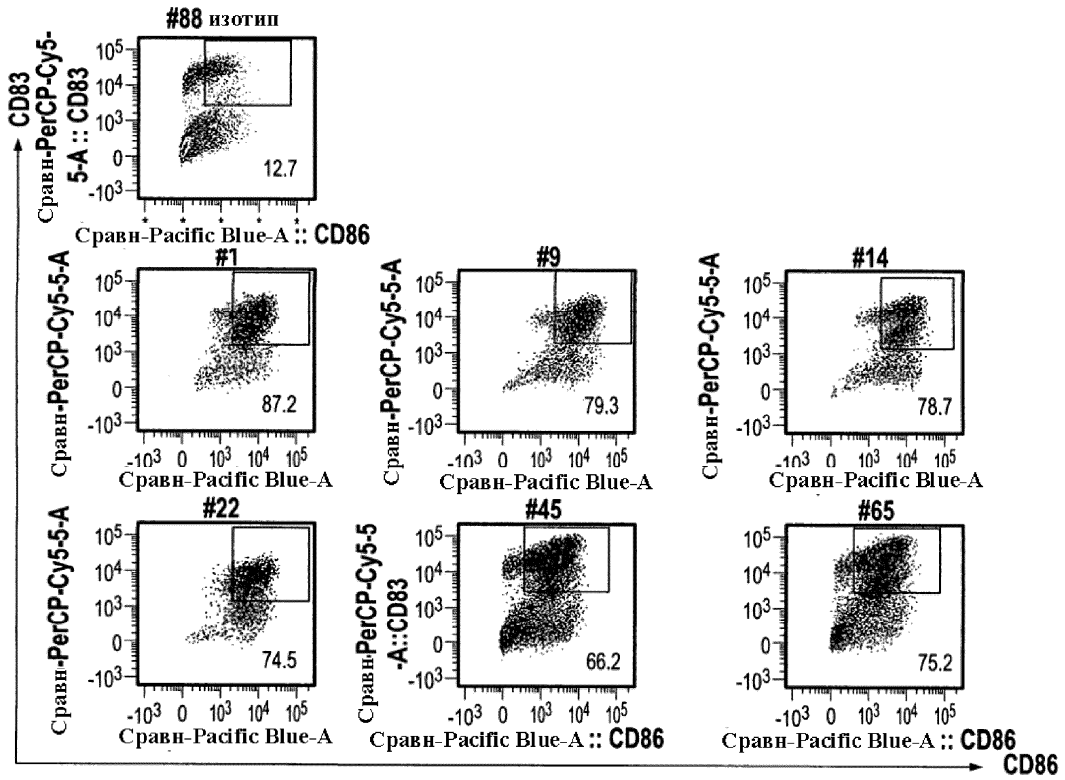
Фиг. 21В



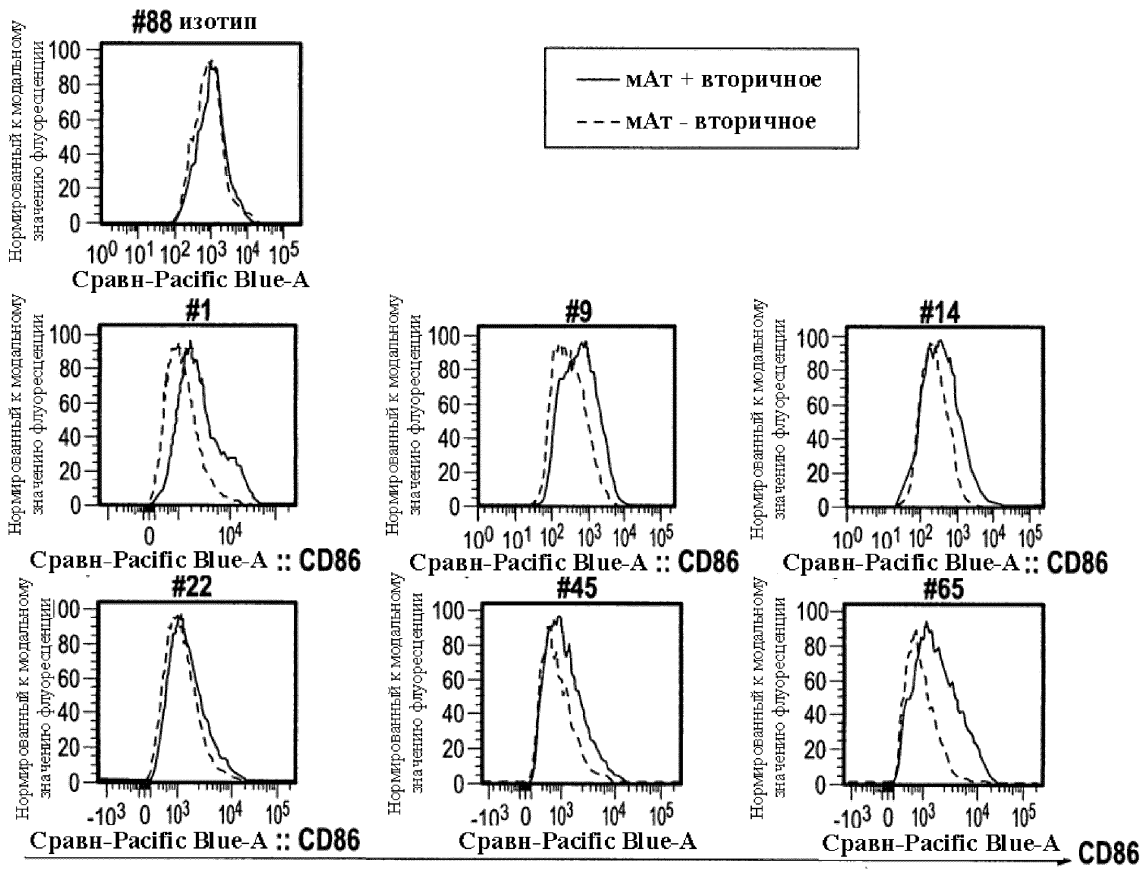
Фиг. 22А



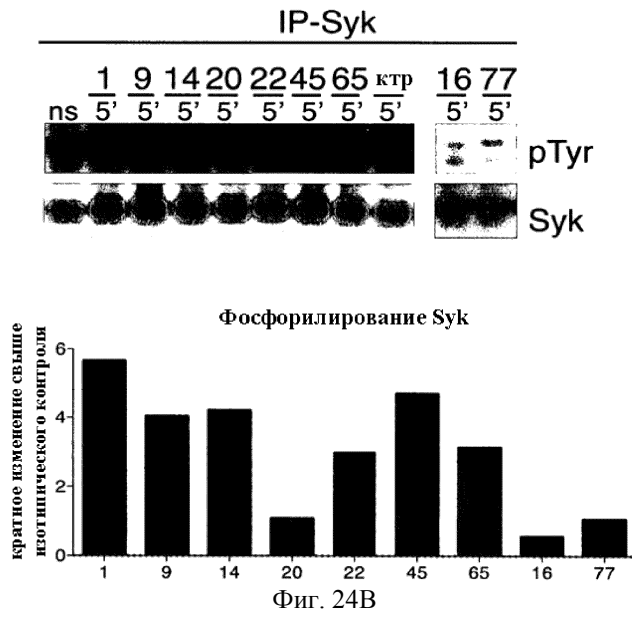
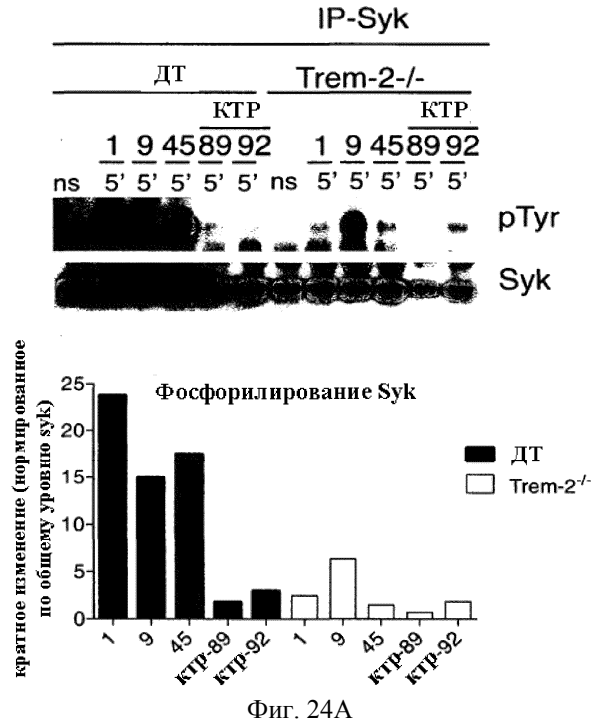
Фиг. 22В



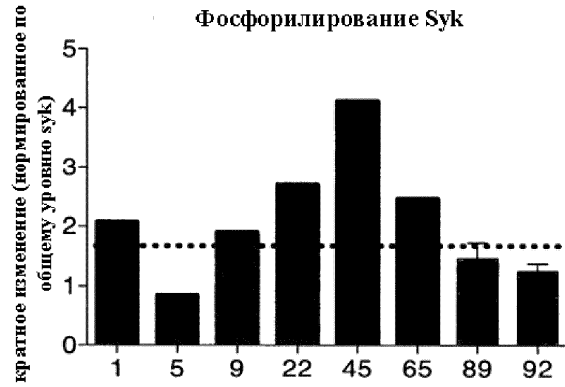
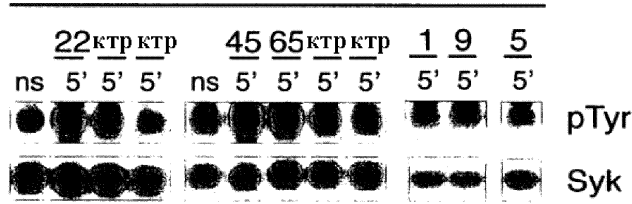
Фиг. 23А



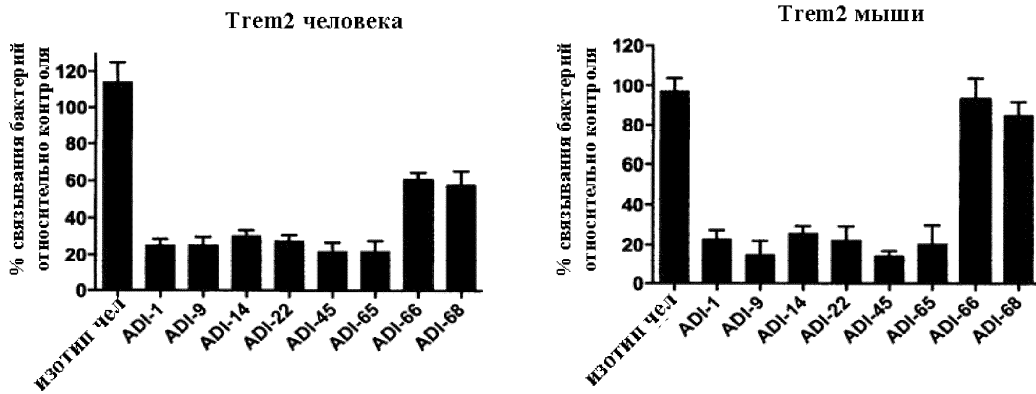
Фиг. 23В



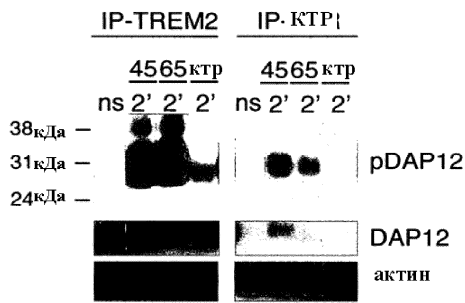
IP-Syk



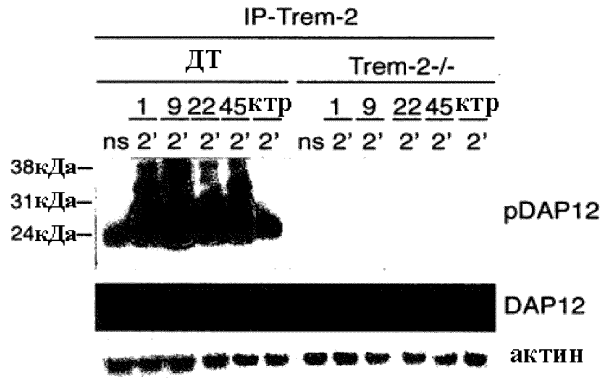
Фиг. 24С



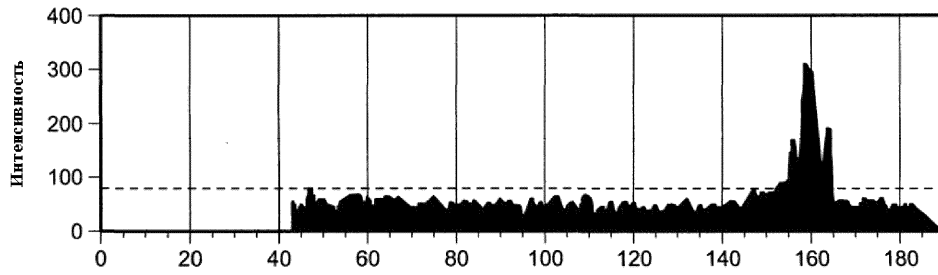
Фиг. 25



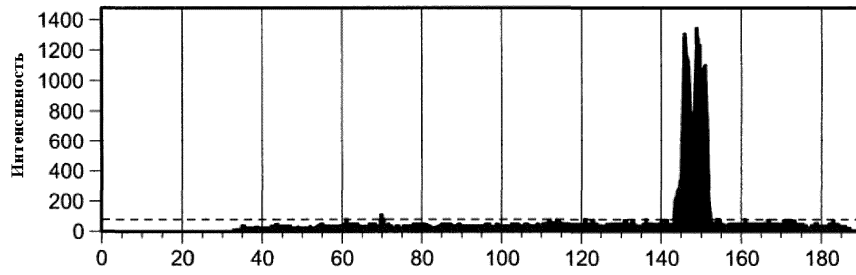
Фиг. 26А



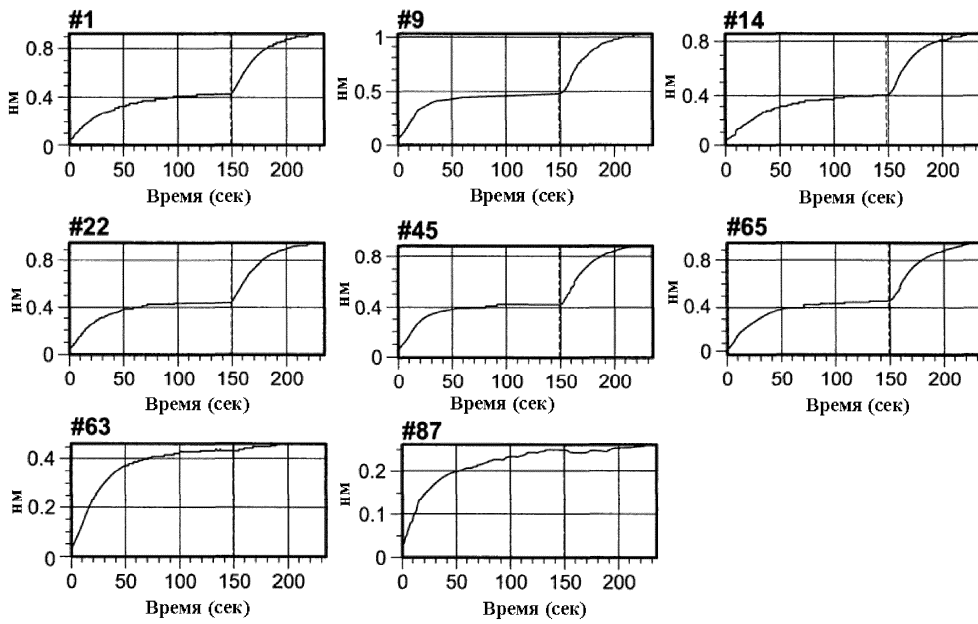
Фиг. 26В



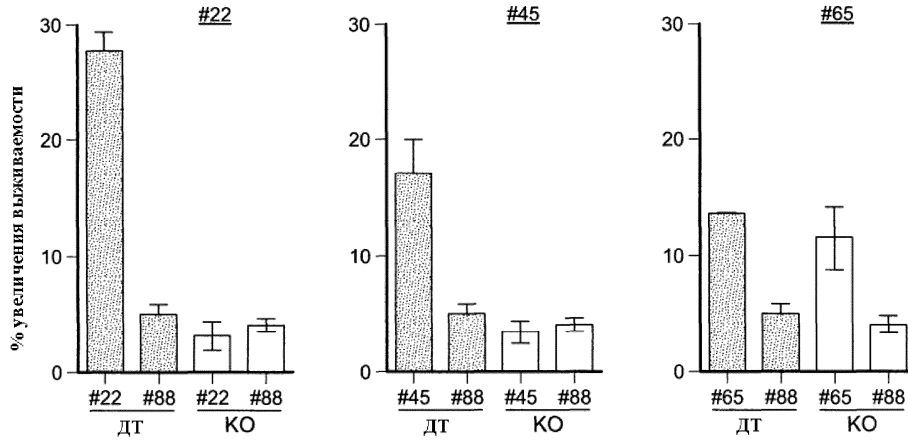
Фиг. 27А



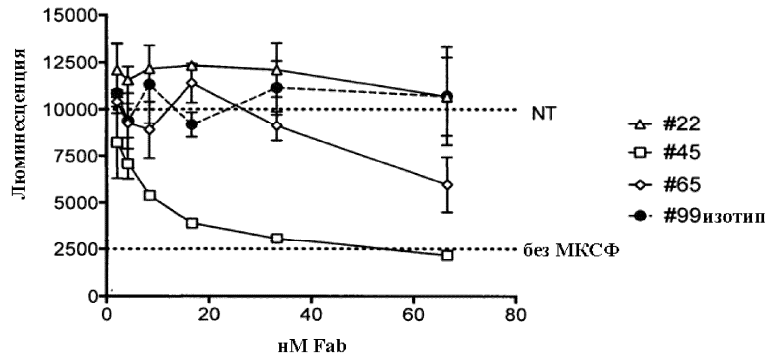
Фиг. 27В



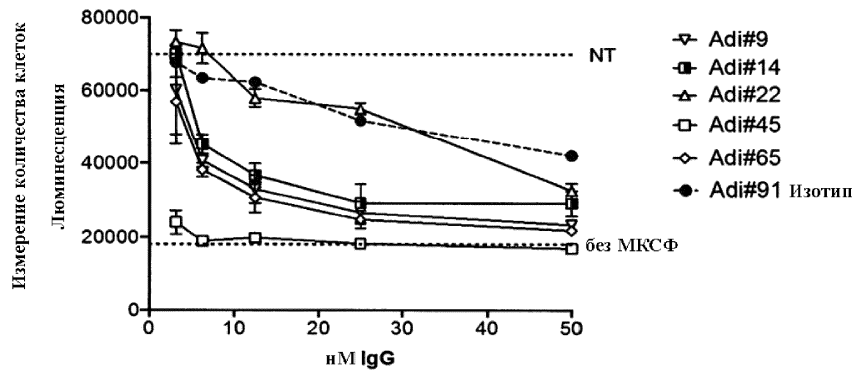
Фиг. 28



Фиг. 29

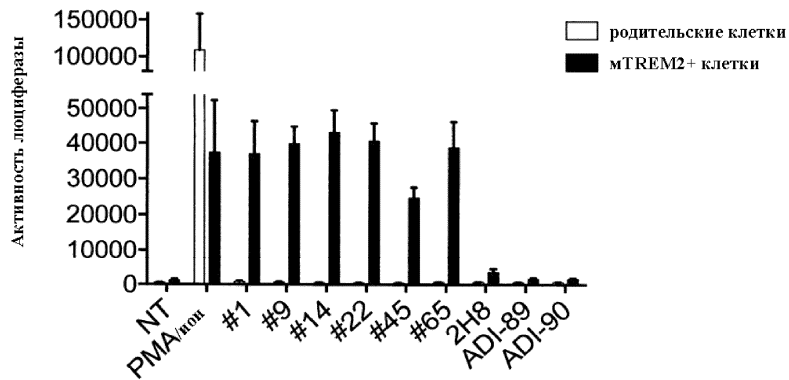


Фиг. 30А

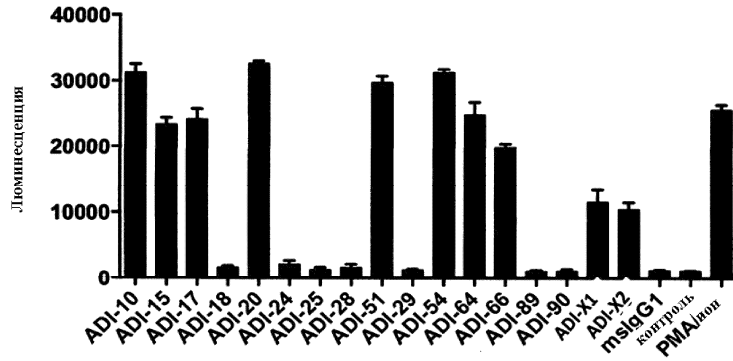


Полноразмерные антитела в растворе

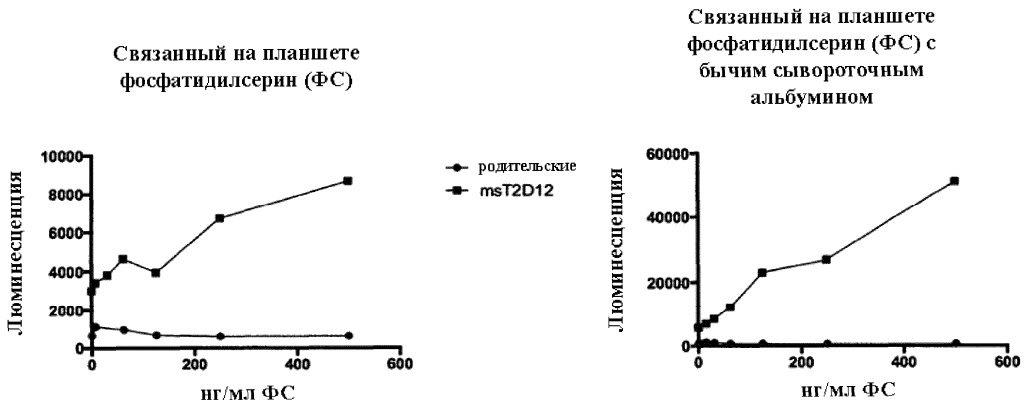
Фиг. 30В



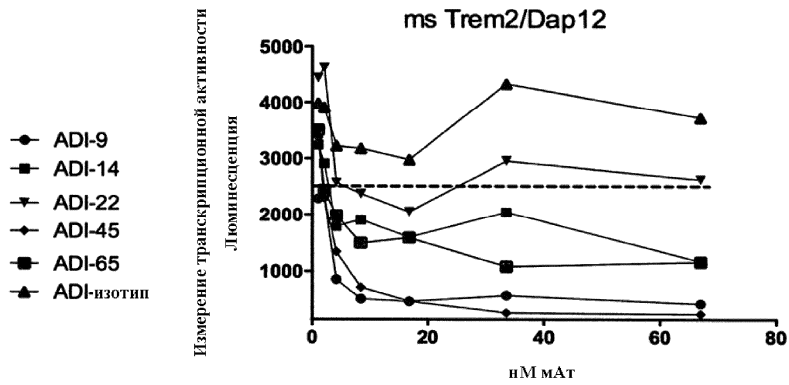
Фиг. 31А



Фиг. 31В

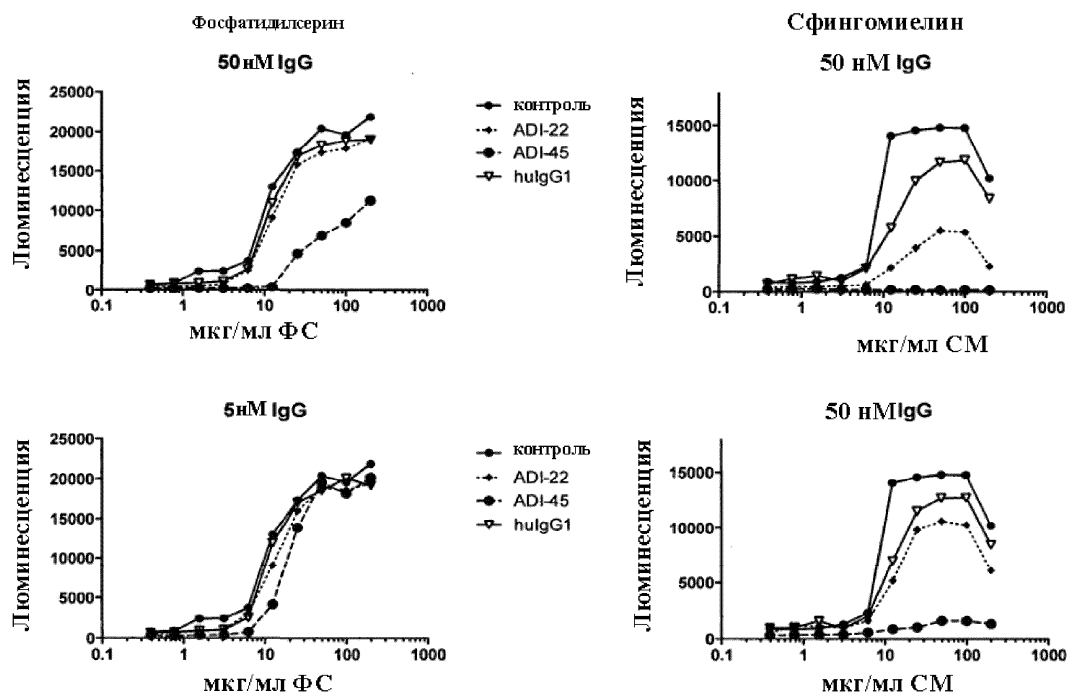


Фиг. 31С



Полноразмерные антитела в растворе

Фиг. 32



Фиг. 33

