

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391648 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.03

(54) БИОМАРКЕРЫ АГОНИСТА TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/120,986; 63/262,943

(32) 2020.12.03; 2021.10.22

(33) US

(86) PCT/US2021/072719

(87) WO 2022/120373 2022.06.09

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Элвонджер Дэниел С., Фолц Иан Н.,
Хассон Сэмюэль А. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания или состояний, ассоциированных с дисфункцией TREM2 у пациента-человека, такого как болезнь Альцгеймера, включающий введение пациенту агониста TREM2. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ анализа биологического образца, отобранного у пациента с болезнью Альцгеймера в отношении биомаркеров для определения потенциальной пользы или того, есть ли у заболевания повышенная вероятность ответа на лечение агонистом TREM2.

A1

202391648

202391648

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578375EA/042

БИОМАРКЕРЫ АГОНИСТА TREM2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

1. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки в полном его объеме. Указанная копия ASCII, созданная 30 ноября 2021 г., названа 004WO_SL_ST25.txt и имеет размер 28469 байт.

2. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к лечению болезни Альцгеймера (AD) с использованием агониста TREM2. Более конкретно, настоящее изобретение относится к определенным биомаркерам болезни Альцгеймера и/или определенным биомаркерам агонизма TREM2, а также к их применению в способах лечения болезни Альцгеймера, например, при оценке и/или прогнозировании ответов пациента на лечение.

3. ПРЕДПОСЫЛКИ

[0003] Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенной причиной прогрессирующей деменции у пожилых людей, от которой страдают более 5,5 миллионов американцев и которая занимает 6-е место среди основных причин смерти в Соединенных Штатах.

[0004] Микроглия представляет собой резидентные макрофаги головного мозга со многими гомеостатическими ролями и ролями в реагировании на повреждение, в том числе трофическими и фагоцитарными функциями. Ответы микроглии, которые модулируют течение заболевания, приводятся в действие патологией, представляющей собой AD. Патологические особенности AD предусматривают внеклеточные амилоидные бляшки, состоящие из пептида амилоида б (A β), внутринейрональные нейрофибриллярные клубки, состоящие из агрегированного гиперфосфорилированного тау-белка, нейроиммунную активацию и снижение плотности синапсов (Long and Holtzman, Cell, 2019). Микроглия накапливается вокруг бляшек A β , чтобы содержать и уплотнять их, тем самым уменьшая уровень маркеров аксональной дистрофии в окружающих нейронах (Yuan et al, Neuron, 2016). Во время этого процесса микроглия изменяет свои фенотипические и транскрипционные свойства, переходя от «гомеостатического» к активированному профилю, например, к траектории микроглии, ассоциированной с заболеванием (DAM) (Carmona et al., The genetic landscape of Alzheimer disease, 1st Ed., 2018).

[0005] Было показано, что переходы микроглии в активированные профили зависят от триггерного рецептора, экспрессируемого в миелоидных клетках 2 (TREM2), рецептора поверхности клеток макрофагов, обильно экспрессируемого в микроглии (Ulland and Colonna, Nat. Rev. Neurol., 2018). TREM2 поддерживает ответ микроглии на стимулы повреждения головного мозга, в том числе апоптотические клетки, повреждение миелина и β -амилоид (A β). Считается, что из-за своей роли в метаболической активации, TREM2

функционирует как костимулирующая молекула, которая поддерживает траектории активации микроглии.

[0006] Активация микроглии через TREM2 может обеспечить многообещающий терапевтический подход при лечении AD, однако воздействие терапии с применением агониста TREM2 в контексте траекторий активации микроглии при болезни Альцгеймера не установлено, что создает значительную неудовлетворенную потребность.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0007] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания или состояний, ассоциированных с дисфункцией TREM2 у пациента-человека, включающий введение пациенту эффективного количества агониста TREM2 для повышения активности триггерного рецептора, экспрессируемого на миелоидных клетках 2 (TREM2). В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ лечения болезни Альцгеймера.

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ анализа биологического образца, отобранного у пациента с болезнью Альцгеймера, для определения потенциальной пользы или того, есть ли у заболевания повышенная вероятность ответа на лечение агонистом TREM2. Другие аспекты предусматривают способ оценки и мониторинга биомаркеров ответов пациента на терапию агонистом TREM2. В некоторых вариантах осуществления биомаркеры агониста TREM2 выбраны из CCL4, CCL2, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B и TMEM119.

[0009] В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ индуцирования активации микроглии у пациента по отношению к траекториям специфических типов клеток микроглии, например к траектории типов интерферон-чувствительной (IFN-R), циклирующей (Cyc-M) или экспрессирующей МНС-II (МНС-II) микроглии, включающий введение пациенту эффективного количества агониста TREM2.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0010] На фиг. 1A-1J показаны свойства антитела-агониста hTREM2 hT2AB. На фиг. 1A показано, что hT2AB специфически связывается с hTREM2, но не связывается с hTREM1 или с mTREM2. Данные показывают сигналы связывания hTREM2-His с hT2AB, измеренные с помощью Octet. 1B12 представляет собой антитело к hTREM1, которое связывается исключительно с hTREM1-His. Ни hTREM1-His, ни hTREM2-His не связываются с нерелевантным hIgG2 (левая панель). hT2AB связывает hTREM2, временно совместно экспрессируя hDAP12 в клетках НЕК293 (клон G13), но не связывает клетки НЕК293, которые экспрессируют mTREM2 и mDAP12 (правая панель). На фиг. 1B-1C показана функциональная EC50 hT2AB в клетках клона G13 (фиг. 1B) и макрофагах, происходящих из моноцитов человека (hMac) (фиг. 1C). Активацию hTREM2 определяли путем измерения индукции фосфорилирования Syk после подвергания клеток воздействию различных концентраций hT2AB (n=8). На фиг. 1D показана активация hTREM2 с помощью hT2AB IgG1 и hT2AB Fab, определенная путем измерения фосфорилирования Syk в клетках клона G13, подвергнутых воздействию различных

концентраций антител ($n=3$). На ФИГ. 1E показано количественное определение sTREM2 в кондиционированных средах из hMac, обработанных различными концентрациями hT2AB или контрольного антитела hIgG1 в течение 24 часов без какой-либо иммунной провокации ($n=4$ для каждой группы). На фиг. 1F показано количественное определение CCL4 в кондиционированных средах из hMac, обработанных hT2AB или контрольным антителом hIgG1 при 200 нМ для различных моментов времени. В качестве положительного контроля применяли ацетилированный LDL ($n=2$ для каждой группы). На фиг. 1G показан анализ жизнеспособности клеток макрофагов, происходящих из костного мозга (BMM), от мышей TREM2CV после выведения CSF1, обработанных различными концентрациями связанного с планшетом hT2AB или контрольного hIgG1 в течение 48 часов ($n=3$ для каждой группы). На фиг. 1H показан анализ связывания hT2AB с BMM от TREM2CV и TREM2R47H. BMM от Trem2^{-/-} использовали в качестве отрицательного контроля. На фиг. 1I показаны репортерные клеточные линии 2B4, экспрессирующие hTREM2 (CV или R47H), стимулированные различными количествами связанного с планшетом hT2AB или контрольного hIgG1. Экспрессию GFP измеряли с помощью проточной цитометрии ($n=2$ для каждой группы). На фиг. 1J показан анализ жизнеспособности клеток BMM от мышей TREM2R47H после выведения CSF1, обработанных связанными с планшетом hT2AB или контрольными hIgG1 при 10 мкг/мл в течение 48 часов. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака. Все данные на фиг. 1 показаны как среднее значение \pm SD, за исключением фиг. 1B-1C, на которых изображено среднее значение \pm SEM.

[0011] На фиг. 2A-2K показаны фармакокинетика и фармакодинамика hT2AB. На фиг. 2A-2E описаны фармакодинамические (PD) исследования hT2AB у самцов мышей TREM2CV, TREM2R47H или Trem2^{-/-}. Различные когорты мышей получали однократную дозу hT2AB внутривенно в диапазоне от 0 (среда-носитель) до 100 мг/кг в течение 24 часов. Концентрации хемокинов, в том числе CXCL10 (фиг. 2A), CCL4 (фиг. 2B), CCL2 (фиг. 2C) и CXCL2 (фиг. 2D), а также биомаркер активации микроглии CST7 (фиг. 2E) измеряли с помощью технологии Meso Scale Discovery (MSD) в лизатах головного мозга (среда-носитель, $n=4$ для TREM2CV, $n=5$ для TREM2R47H или Trem2^{-/-}; 1, 3 и 10 мг/кг, $n=2$ для TREM2CV или TREM2R47H; 30 мг/кг, $n=5$ для всех трех генотипов, 100 мг/кг, $n=2$ для TREM2CV или TREM2R47H, $n=5$ для Trem2^{-/-}). На фиг. 1F-K описана однократная доза hT2AB, введенная внутривенно самцам мышей TREM2R47H или Trem2^{-/-} при 30 мг/кг. Различные когорты мышей умерщвляли через 4, 8 и 24 часа после обработки антителами, а ткани головного мозга собирали и лизировали для измерения уровней антител hT2AB и экспрессии биомаркеров активации ассоциированной с нейродегенерацией микроглии, ($n=5$ для каждой группы). На фиг. 2F показано, что концентрация hT2AB в головном мозге (нМ) в ~ 25 раз превышает значения EC50 для фосфорилирования Syk (222 пМ) в клетках клона G13 в течение до 24 часов после внутривенного введения 30 мг/кг hT2AB. Анализ qRT-PCR показывает повышенную

экспрессию *Cxcl10* (фиг. 2G), *Ccl2* (фиг. 2H), *Ccl4* (фиг. 2I), *Cst7* (фиг. 2J), а также гомеостатического маркера микроглии *Tmem119* (K) при лечении с помощью hT2AB. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ****, $P < 0,0001$ * согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака; все данные показаны как среднее значение \pm SD.

[0012] На фиг. 3A-3G показаны отборы образцов микроглии из моделей мышей TREM2-tg-5XFAD человека. На фиг. 3A показан дизайн протокола. Через два дня после инъекции антител клетки CD45⁺ собирали из коры головного мозга самцов и самок мышей 5XFAD с эндогенным нокаутом *Trem2* (*Trem2*^{-/-}) с одним из двух вариантов нокина TREM2 человека или без него: общий вариант (CV) и R47H. 71303 клетки прошли контроль качества scRNA-seq. На фиг. 3B-3D показана классификация контролируемых типов иммунных клеток. Индивидуальным клеткам был присвоен показатель сходства с 830 образцами микрочипов отсортированных иммунных клеток мыши, созданных в рамках проекта Immunologic Genome Project. Клетки были встроены в латентное пространство более низкого измерения, блокируя наблюдаемые коварианты. Метки типов клеток были скорректированы обогащенным типом клеток каждого сегмента латентного пространства. На фиг. 3E показана единая аппроксимация и проекция совокупности (UMAP) всех клеток, представляющих глобальную структуру данных; клетки окрашены 10 идентифицированными типами иммунных клеток. На фиг. 3E показана дифференциальная экспрессия генов микроглии. Абсолютные различия в уровнях экспрессии с другими клетками CD45⁺ количественно оценивают по размеру эффекта; специфичность экспрессии генов и степень обнаружения генов определяли с использованием условных вероятностей с единичными априорными значениями для типов клеток, чтобы избежать смещения размера выборки. Специфичность определяли апостериорной вероятностью того, что клетка принадлежит к определенному типу клеток при условии, что она экспрессирует конкретный ген; уровень обнаружения определяли по относительной фракции клеток, экспрессирующих конкретный ген. На фиг. 3G показаны профили экспрессии 13 сигнатурных генов микроглии, отвечающих порогу специфичности 0,6 и порогу размера эффекта 2,5, а также периваскулярных генных маркеров *Mrc1* и *Pf4*, а также маркеров Т-клеток *Cd3g* и *Ms4a4*; показано среднее значение экспрессии субкомпонентов a, b и c комплемента *C1q*.

[0013] На фиг. 4A-4E показаны характеристики активированных популяций микроглии. На фиг. 4A показано, что неконтролируемая кластеризация идентифицировала 10 различных субпопуляций, охватывающих траекторию от гомеостатической микроглии к четырем терминальным фенотипам. На фиг. 4B показаны таблицы сопряженности признаков, в которых подсчитывают совпадения (диагональные) и расхождения (недиагональные) между профилем экспрессии популяции микроглии, активируемой болезнью (DAM), описанной Keren-Shaul et al. (9) и каждый кластер в этом исследовании; количественные оценки основаны на (\log_2) 0,5-кратных повышающих и понижающих регуляциях генов по сравнению с гомеостатической популяцией. Показатель сходства

рассчитывают путем вычитания недиагональных значений из суммы диагональных значений; P-значения рассчитывают, тестируя общую согласованность между обоими исследованиями. Можно наблюдать увеличение сходства экспрессии генов по траектории от t1 через t6 к выделенному красным кластеру DAM из этого исследования. На фиг. 4C показана оценка состояний клеточного цикла. С помощью машинного обучения было предсказано, что каждая клетка находится в фазе G1, G2/M или S. Один кластер, выделенный желтым цветом, Cus-M, демонстрирует сильное обогащение циклирующими клетками. На фиг. 4D показан анализ дифференциальной экспрессии, выявляющий один кластер, IFN-R, который показывает обогащение генов, связанных с путем интерферона (фиг. 4D), и один кластер, MHC-II, обогащенный в генах, кодирующих члены белкового комплекса MHC класса II (фиг. 4E). Экспрессия выбранных маркерных генов показана на фиг. 4D, а все гены MHC класса I/II, аннотированные в Gene Ontology (GO), показаны на фиг. 4E. Точный критерий Фишера с коррекцией уровня ложноположительных результатов (FDR) применяли для анализа обогащения терминов GO.

[0014] На фиг. 5A-E показаны управляемые генотипом эффекты в отношении исходов микроглии. На фиг. 5A показаны дерево траектории и визуализация вычисленных линейных траекторий от t5 к каждому типу терминальных клеток. Псевдовремя было выведено путем подгонки основных кривых (черные линии) в совокупности более низкого измерения. Каждая точка данных представляет собой клетку, окрашенную в соответствии с ее псевдовременным положением по всей линии траектории. На фиг. 5B-5E показаны относительная фракция каждого генотипа и его реплик во всех псевдовременных интервалах (верхняя панель); представление было скорректировано для разных размеров выборок. Нижняя панель показывает распределения установленных фракций клеток в интервале псевдовремени 90-100% с применением бутстрэппинга.

[0015] На фиг. 6A-6B показано влияние лечения с помощью hT2AB в отношении траектории микроглии. На фиг. 6A показаны оцененные относительные размеры популяции за временной интервал по всей линии каждой траектории, начиная от точки разветвления по направлению к типу терминального конца. На фиг. 6B показан основанный на траектории анализ дифференциальной экспрессии ранней и поздней стадий дифференциации микроглии. P-значения были рассчитаны с применением статистики Вальда и скорректированы для множественного тестирования с помощью уровня ложноположительных результатов (FDR). FDR взвешивали (wFDR) по знаку логарифма кратности изменения S по FDRS и трансформировали $-\log_{10}$. Отрицательные значения обозначают подавление, вызванное hT2AB, положительные значения указывают на усиление. С применением порогового значения FDR, равного 0,01, транскрипционные изменения были классифицированы по шести категориям; два переходных с ранней повышающей/понижающей регуляцией, сходящейся к исходному уровню; четыре постоянных с ранней и поздней повышающей/понижающей регуляцией или только с поздней повышающей/понижающей регуляцией соответственно.

[0016] На фиг. 7A-7B показано, что продолжительное острое лечение с помощью

mT2AB по-разному влияет на ответы микроглии в отношении патологии. На фиг. 7A представлена схематическая диаграмма лечения мышинным mT2AB у мышей TREM2CV-5XFAD или TREM2R47H-5XFAD. Мышам возрастом двадцать недель вводили внутривентриально мышинный mT2AB в дозе 30 мг/кг каждые 3 дня в течение 10 дней. Мышам из того же помета вводили такую же концентрацию контрольного антитела mIgG1. Мышей умерщвляли через 24 часа после последней инъекции антител и собирали головной мозг для иммуногистохимического и биохимического анализа. На фиг. 7B показано количественное определение уровня цитокинов и хемокинов, таких как IL-1 β , CXCL10 и CCL4, в лизатах коры головного мозга в различных группах лечения. *, P < 0,05; ***, P < 0,001; ****, P < 0,0001 согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака. Данные показаны как среднее значение \pm SD в (E). TREM2CV-5XFAD, самец, mIgG1, n=8; TREM2CV-5XFAD, самец, mT2AB, n=9; TREM2CV-5XFAD, самка, mIgG1, n=5; TREM2CV-5XFAD, самка, mT2AB, n=6; TREM2R47H-5XFAD, самец, mIgG1, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самец, mT2AB, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самка, mIgG1, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самка, mT2AB, n=6.

[0017] На фиг. S1A-S1D показан контроль качества одноклеточного РНК-секв. На фиг. S1A 24 образца были собраны и подвергнуты индивидуальному выравниванию ридов и контролю качества капель и клеток. На фиг. S1B показана интегративная оценка качества данных, выявляющая технические артефакты в данных, вероятно, управляемые низким охватом клеточного транскриптома. Клетки окрашивают в отношении показателя качества клеток (CQ), полученного в результате анализа основных компонентов выбранных показателей качества. Указаны группы, обогащенные клетками с низкими показателями CQ. На фиг. S1C показано определение отсечки для фильтрации клеток с использованием инверсионной эмпирической кумулятивной функции распределения показателей CQ. Определенный порог -0,1 сохранил 8,6% клеток в обогащенной группе с низким CQ и 88,9% всех остальных клеток. На фиг. S1D показано распределение общих показателей качества для каждой клетки в образце. Образцы характеризуются вариантом TREM2 человека, полом и измеренным воздействием hT2AB на головной мозг. Также показано соотношение между необработанной экспрессией эндогенного локуса Trem2 и трансгенного локуса TREM2 человека во всех собранных клетках.

[0018] На фиг. S2 показано обогащение терминов GO для маркерных генов IFN-R микроглии. Маркерные гены IFN-R, отвечающие порогу специфичности 0,75 и размеру эффекта 1,5, подвергали анализу обогащения терминов генной онтологии. Показаны термины биологического процесса со значением P точного критерия Фишера < 0,05, скорректированным по уровню ложноположительных результатов (FDR). Термины сгруппированы и окрашены в соответствии с их онтологическим отношением, квадратные размеры соответствуют количеству маркерных генов IFN-R, обнаруженных в этой категории, а глубину цвета масштабируют по FDR.

[0019] На фиг. S3A-S3B показана гармонизация выборки. На фиг. S3A показаны аннотированные клетки микроглии от контрольных леченных hIgG1 самок и самцов

мышей TREM2^{cv}-5XFAD, которые применяли в качестве эталона для классификации клеток из оставшихся 5 состояний (запросы Q1-Q5). Во-первых, каждый набор запросов был объединен с каждым эталонным набором с использованием карт диффузии, а затем скорректирован с учетом пакетных эффектов с помощью взаимной коррекции ближайших соседей. Затем типы клеток были спроецированы с использованием классификатора Extreme Gradient Boosting, обученного на диффузионных компонентах клеток запроса. На фиг. S3B показаны оценки точности модели. Точность обучения на эталонном или запросном наборе данных, а также точность предсказания проецируемых типов клеток на наборе эталонных данных с использованием классификатора, обученного на наборе данных запроса.

[0020] На фиг. S4A-S4E показаны ассоциированные с полом различия мышей в исходах микроглии. Показаны распределения установленных фракций клеток в терминальном интервале псевдвремени 90-100% с использованием бутстрэппинга (верхняя панель) и подобранная динамика экспрессии для 10 лучших маркерных генов (нижняя панель) для DAM (фиг. S4A), Сус-М (фиг. S4B), IFN-R (фиг. S4C) и МНС-II (фиг. S4D). На фиг. S4E показано количественное определение растворимых и нерастворимых Ar31_40 и A131_42 в лизатах гиппокампа контрольных мышей 5XFAD, которых обрабатывали с помощью hIgG1. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака. Данные представлены как среднее значение \pm SD; столбцы слева показывают данные для мышей-самцов, столбцы справа показывают данные для мышей-самок.

[0021] На фиг. S5A-C показано, что продолжительное острое лечение мышиним mT2AB не меняет нагрузку A β . На фиг. S5A показана количественная оценка растворимых и нерастворимых Ar31_40 и Ar31_42 в лизатах коры головного мозга в различных группах лечения. На фиг. S5B показаны репрезентативные конфокальные изображения мышей TREM2^{cv}-5XFAD, обработанных мышиним mT2AB, окрашенным 6E10 (белый), метокси-X04 (синий) и A β 42 (красный), демонстрирующие распределение A β в коре головного мозга. Планка=100 Rm. На фиг. S5C показаны кратные изменения площади покрытия 6E10+, метокси-X04+ или A β 42+ в коре головного мозга между группами, обработанными мышиним mT2AB, и контрольной группой, обработанной mIgG1. Данные показаны как среднее значение \pm SEM. TREM2^{cv}-5XFAD, самец, mIgG1, n=8; TREM2^{cv}-5XFAD, самец, mT2AB, n=9; TREM2^{cv}-5XFAD, самка, mIgG1, n=5; TREM2^{cv}-5XFAD, самка, mT2AB, n=6; TREM2R47H-5XFAD, самец, mIgG1, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самец, mT2AB, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самка, mIgG1, n=4; TREM2R47H-5XFAD, самка, mT2AB, n=6. ', $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$ согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака. Данные показаны как среднее значение \pm SEM.

6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

6.1. Определения

[0022] Если не указано иное, то все используемые в настоящем документе

технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает рядовой специалист в данной области. Соответственно, следующие термины имеют приведенные ниже значения.

[0023] «Агонист» или «активирующее» средство, такие как соединение или антитело, представляют собой средство, которое индуцирует (например, усиливает) одно или более из видов активности или функций мишени (например, TREM2) средства после того, как средство связывается с мишенью.

[0024] «Антагонист» или «блокирующее» средство, такие как соединение или антитело, представляют собой средство, которое уменьшает или устраняет (например, уменьшает степень) связывание мишени с одним или более лигандами после того, как средство связывает мишень, и/или которое уменьшает или устраняет (например, уменьшает степень) одно или более из видов активности или функций мишени после того, как средство связывает мишень. В некоторых вариантах осуществления средство-антагонист или блокирующее средство существенно или полностью подавляет связывание мишени с одним или более ее лигандами и/или одно или более из видов активности или функций мишени.

[0025] «Антитело» используется в самом широком смысле и относится к иммуноглобулину или его фрагменту и предусматривает любой такой полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент или область антитела. Распознанные гены иммуноглобулинов предусматривают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также разнообразие генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи обычно классифицируют как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Классы иммуноглобулинов также можно дополнительно разделить на подклассы, в том числе подклассы IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄; и подклассы IgA: IgA₁ и IgA₂. Термин включает без ограничения поликлональные, моноклональные, моноспецифические, мультиспецифические (например, биспецифические антитела), природные, гуманизированные, человеческие, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутированные, привитые, фрагменты антител (например, часть полноразмерного антитела, как правило его антигенсвязывающая или переменная область, например фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv) и антитела, полученные *in vitro*, при условии, что они проявляют необходимую биологическую активность. Термин также включает одноцепочечные антитела, например одноцепочечные антитела Fv (sFv или scFv), в которых переменная область тяжелой и переменная область легкой цепи соединены вместе (непосредственно или посредством пептидного линкера) с образованием непрерывного полипептида.

[0026] Антитела, описанные в настоящем документе, во многих вариантах осуществления описаны посредством их соответствующих полипептидных последовательностей с использованием однобуквенного обозначения аминокислот. Если

не указано иное, то полипептидные последовательности представлены в ориентации N→C.

[0027] «Изолированный» относится к изменению естественного состояния, то есть измененному и/или удаленному из его исходной окружающей среды. Например, полинуклеотид или полипептид (например, антитело) являются выделенными, когда их отделяют от материала, с которым они природным образом ассоциированы в природной окружающей среде. Таким образом, «выделенное антитело» представляет собой антитело, которое было выделено и/или извлечено из компонента его природной окружающей среды.

[0028] «Очищенное антитело» относится к препарату на основе антитела, в котором содержание антител составляет по меньшей мере 80% или больше, по меньшей мере 85% или больше, по меньшей мере 90% или больше, по меньшей мере 95% или больше по весу по сравнению с другими примесями (например, другими белками) в препарате, как, например, путем определения с использованием SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) или капиллярного электрофореза- (CE) SDS в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях.

[0029] «Внеклеточный домен» и «эктодомен» используются взаимозаменяемо при использовании в отношении мембраносвязанного белка и относятся к части белка, которая экспонируется на внеклеточной стороне липидной мембраны клетки.

[0030] «Специфически связывается» в контексте любого связывающего средства, например антитела, относится к связывающему средству, которое специфически связывается с антигеном или эпитопом, например с высокой аффинностью, и не связывается в значительной степени с другими неродственными антигенами или эпитопами.

[0031] «Функциональная» относится к форме молекулы, которая обладает либо нативной биологической активностью существующей в природе молекулы ее типа, либо любой конкретной необходимой активностью, например судя по ее способности связываться с молекулами лиганда. Примеры «функциональных» полипептидов включают антитело, специфически связывающееся с антигеном посредством его антигенсвязывающей области.

[0032] «Антиген» относится к веществу, такому как без ограничений конкретный пептид, белок, нуклеиновая кислота или углевод, которые могут связываться со специфическим антителом.

[0033] «Эпитоп» или «антигенная детерминанта» относятся к той части антигена, которая способна распознаваться и специфически связываться конкретным антителом. Когда антиген представляет собой полипептид, то эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот и/или несмежных аминокислот, совмещенных в результате третичной укладки белка. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный из смежных аминокислот на линейной последовательности аминокислот. Линейный эпитоп может сохраняться при денатурации белка. Конформационный или структурный эпитоп

представляет собой эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые не являются смежными и, таким образом, состоят из отдельных частей линейной последовательности аминокислот, которые сближаются друг с другом за счет укладки молекулы, как, например, посредством вторичной, третичной и/или четвертичной структур. Конформационный или структурный эпитоп может быть потерян при денатурации белка. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может содержать по меньшей мере 3, и чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Таким образом, эпитоп, используемый в настоящем документе, предусматривает определенный эпитоп, в котором антитело связывает только части определенного эпитопа. В уровне техники известно множество способов картирования и определения местоположения эпитопов на белках, в том числе раскрытие кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии генных фрагментов, анализы мутаций и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в разделе «Применение антител» в *A Laboratory Manual*, Chapter 11, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1999).

[0034] «Белок», «полипептид» или «пептид» означает полимер по меньшей мере из двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование, миристоилирование, убиквитинирование и т. д.). В это определение включены D- и L-аминокислоты и смеси D- и L-аминокислот. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности белка, полипептида или пептида представлены в настоящем документе в обычной ориентации от N-конца к C-концу.

[0035] «Полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к двум или более нуклеозидам, ковалентно связанным друг с другом. Полинуклеотид может полностью состоять из рибонуклеозидов (т. е. РНК), полностью состоять из 2'-дезоксирибонуклеозидов (т. е. ДНК) или смесей рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов. Нуклеозиды, как правило, будут связаны между собой сахаро-фосфатными связями (сахаро-фосфатный остов), но полинуклеотиды могут включать одну или более нестандартных связей. Неограничивающие примеры таких нестандартных связей включают фосфорамидаты, фосфоротиоаты и амиды (см., например, Eckstein, F., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)).

[0036] «Функционально связанный» или «функционально ассоциированный» относится к ситуации, в которой две или более полинуклеотидных последовательностей расположены таким образом, чтобы обеспечить их обычную функциональность. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он способен контролировать экспрессию последовательности. Другие контрольные последовательности, такие как энхансеры, сайты связывания или входа рибосомы, сигналы терминации, последовательности полиаденилирования и сигнальные

последовательности, также функционально связаны, чтобы обеспечить их надлежащую функцию при транскрипции или трансляции.

[0037] Термины «положение аминокислоты» и «остаток аминокислоты» используются взаимозаменяемо для обозначения положения аминокислоты в полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток может быть представлен как «XN», где X представляет собой аминокислоту, и N представляет ее положение в полипептидной цепи. Если две или более вариации, например полиморфизмы, встречаются в одном и том же аминокислотном положении, то вариации могут быть представлены знаком «/», разделяющим вариации. Замена одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком в определенном положении остатка может быть представлена XNY, где X представляет собой исходную аминокислоту, N представляет собой положение в полипептидной цепи, и Y представляет собой заместительную или замещающую аминокислоту. Когда эти термины используются для описания полипептида или пептидной части по отношению к более крупному полипептиду или белку, первое указываемое число описывает положение, в котором начинается полипептид или пептид (т. е. аминоконец), а второе указываемое число описывает, где заканчивается полипептид или пептид (т. е. карбоксильный конец).

[0038] «Поликлональное» антитело относится к композиции молекул различных антител, которые способны связываться или вступать в реакцию с несколькими различными специфическими антигенными детерминантами на одном и том же или на разных антигенах. Поликлональное антитело также можно рассматривать как «коктейль из моноклональных антител». Поликлональные антитела могут быть любого происхождения, например химерными, гуманизированными или полностью человеческими.

[0039] «Моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным способом, описанным Kohler et al., 1975, Nature 256:495-7, или способами рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть выделены, например, из библиотек фаговых антител.

[0040] «Химерное антитело» относится к антителу, состоящему из компонентов по меньшей мере из двух разных источников. Химерное антитело может содержать часть антитела, полученного из первого вида, слитую с другой молекулой, например частью антитела, полученного из второго вида. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит часть антитела, полученного от животного, отличного от человека, например мыши или крысы, слитую с частью антитела, полученного от человека. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит всю или часть

вариабельной области антитела, полученного от животного, отличного от человека, слитого с константной областью антитела, полученного от человека.

[0041] «Гуманизированное антитело» относится к антителу, которое обладает специфичностью связывания донорного антитела, например области CDR донорного антитела, такого как мышинное моноклональное антитело, привитые к человеческим каркасным последовательностям. «Гуманизированное антитело» обычно связывается с тем же эпитопом, что и донорное антитело.

[0042] «Полностью человеческое антитело» или «человеческое антитело» относится к антителу, которое содержит только белковые последовательности человеческого иммуноглобулина. Полностью человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцируется в клетке, отличной от человеческой, например в мышинной клетке или в гибридومه, полученной из мышинной клетки.

[0043] «Полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как антитело к TREM2 по настоящему изобретению, в его практически интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, целые антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая область Fc. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены нативной последовательности человека) или варианты их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

[0044] «Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части полноразмерного антитела, как правило, к его антигенсвязывающему или вариабельному домену. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, которые связывают два или более различных антигена. Несколько примеров фрагментов антител, содержащих виды стехиометрии повышенного связывания или переменные валентности (2, 3 или 4), включают триатела, трехвалентные антитела и тримерные тела, тетратела, tandAbs[®], диатела и молекулы (sc(Fv)₂)₂, и все они могут быть применены в качестве связывающих средств для связывания с высокой аффинностью и авидностью с растворимыми антигенами (см., например, Cuesta et al., 2010, Trends Biotech. 28:355-62).

[0045] Фрагмент антитела «одноцепочечный Fv» или «sFv» содержит домены VH и VL антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать необходимую структуру для связывания антигена. Обзор sFv см. в Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, pp. 269-315, Rosenberg and Moore, eds., Springer-Verlag, New York (1994).

[0046] «Диатела» относятся к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи

(VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При применении короткого линкера, позволяющего спаривать два домена в одной цепи, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта.

[0047] «Антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающая часть» относится к области или части антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывается с частью или всем антигеном и комплементарна им. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может связываться только с определенной частью антигена (например, эпитопом), особенно если антиген большой. Антигенсвязывающий домен может содержать одну или более переменных областей антитела, в частности переменную область легкой цепи (VL) антитела и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела, и, в частности, определяющие комплементарность области (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

[0048] «Переменная область» и «переменный домен» используются взаимозаменяемо для обозначения полипептидной области, которая придает характеристики связывания и специфичности каждому конкретному антителу. Переменную область тяжелой цепи антитела обозначают как «VH», а переменную область легкой цепи антитела обозначают как «VL». Основная переменность последовательности обычно локализована в трех областях переменного домена, обозначенных как «гиперпеременные области» или «CDR» в каждой из областей VL и VH, и образует сайт связывания антигена. Более консервативные части переменных доменов называют каркасной областью FR.

[0049] «Область, определяющая комплементарность» и «CDR» используются взаимозаменяемо для обозначения несмежных антигенсвязывающих областей, обнаруженных в переменной области полипептидов тяжелой и легкой цепей молекулы антитела. В некоторых вариантах осуществления CDR также описана как «гиперпеременные области» или «HVR». Как правило, встречающиеся в природе антитела содержат шесть CDR, три в VH (обозначаемые как: CDR H1 или H1; CDR H2 или H2 и CDR H3 или H3) и три в VL (обозначаемые как: CDR L1 или L1; CDR L2 или L2 и CDR L3 или L3). Домены CDR были определены с использованием различных подходов, и следует понимать, что CDR, определенные с помощью различных подходов, должны быть включены в настоящий документ. При подходе «Kabat» для определения CDR используют изменчивость последовательности, и он является наиболее часто используемым (Kabat et al., 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed." NIH 1:688-96). При «Chothia» используют расположение структурных петель (Chothia and Lesk, 1987, J Mol Biol. 196:901-17). CDR, определяемые с помощью «AbM», представляют собой компромисс между подходами Kabat и Chothia и могут быть определены с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular AbM (см. Martin et al., 1989, Proc. Natl Acad Sci USA. 86:9268; также см. www.bioinf.org.uk/abs). Очертания «контактных» CDR основаны на анализе известных

кристаллических структур антитело-антиген (см., например, MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262, 732-45). CDR, очерченные этими способами, обычно включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или их подмножества при сравнении друг с другом.

[0050] Следует понимать, что точные номера остатков, которые охватывают конкретный CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR, и специалисты в данной области могут обычным способом определить, какие остатки включают конкретный CDR, учитывая аминокислотную последовательность варибельной области антитела.

[0051] При Kabat, выше, также определяли систему нумерации последовательностей варибельных доменов, применимую к любому антителу. Систему нумерации Kabat обычно применяют для обозначения остатка в варибельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU или Kabat» или «индекс EU», как правило, применяют, когда речь идет об остатке в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, указанный в Kabat et al., выше). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатков антитела IgG1 EU человека. Ссылки на номера остатков в варибельном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации Kabat. Ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU или по системе Kabat (например, см. публикацию патента США № 2010-280227). Специалист в данной области может присвоить эту систему «нумерации Kabat» любой последовательности варибельного домена.

[0052] Соответственно, если не указано иное, то ссылки на количество конкретных аминокислотных остатков в антителе или антигенсвязывающем фрагменте даны в соответствии с системой нумерации Kabat.

[0053] «Каркасная область» или «область FR» относится к аминокислотным остаткам, которые являются частью варибельной области, но не являются частью CDR (например, с использованием определения Kabat, Chothia или AbM). Варибельная область антитела обычно содержит четыре области FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, области FR в области VL возникают в следующей последовательности: FR_L1-CDR L1-FR_L2-CDR L2-FR_L3-CDR L3-FR_L4, в то время как области FR в области VH возникают в следующей последовательности: FR1_H-CDR H1-FR_H2-CDR H2-FR_H3-CDR H3-FR_H4.

[0054] «Константная область» или «константный домен» относится к области легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, отличительной от варибельной области. Константный домен тяжелой цепи обычно содержит по меньшей мере один из следующих доменов: домен CH1, шарнирную область (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю шарнирную область), домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах

осуществления антитело может иметь дополнительные константные домены СН4 и/или СН5. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит полипептид, содержащий домен СН1; полипептид, содержащий домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептид, содержащий домен СН1 и домен СН3; полипептид, содержащий домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептид, содержащий домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид, который предусматривает домен СН3. Константный домен легкой цепи относится к СL и в некоторых вариантах осуществления может представлять собой константную область каппа или лямбда. Однако рядовому специалисту в данной области должно быть понятно, что эти константные домены (например, тяжелая цепь или легкая цепь) могут быть модифицированы таким образом, что они различаются аминокислотной последовательностью от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

[0055] «Fc-область» или «Fc-часть» относится к С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. Fc-область может представлять собой Fc-область с нативной последовательностью или не встречающийся в природе вариант Fc-области. В общем, Fc-область иммуноглобулина содержит константные домены СН2 и СН3. Хотя границы Fc-области могут варьироваться, в некоторых вариантах осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека может быть определена как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении С226 или от Р230 до его карбокси-конца. В некоторых вариантах осуществления «домен СН2» Fc-области IgG человека, также обозначаемый как «Сγ2», обычно простирается от приблизительно аминокислотного остатка 231 до приблизительно аминокислотного остатка 340. В некоторых вариантах осуществления N-связанные углеводные цепи могут быть вставлены между двумя доменами СН2 интактной нативной молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления «домен СН3» Fc-области IgG человека содержит С-концевые остатки к домену СН2, например от приблизительно аминокислотного остатка 341 до приблизительно аминокислотного остатка 447 Fc-области. «Функциональная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Типичные «эффекторные функции» Fc предусматривают, среди прочего, связывание С1q; комплементзависимая цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора LT) и т. д. Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела) и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в уровне техники.

[0056] «Нативная последовательность Fc-области» включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Fc-области человека с нативной последовательностью

предусматривают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью (не-A и A-аллотипы); Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты.

[0057] «Вариант Fc-области» включает аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации, предпочтительно одной или более аминокислотной(ых) замены(замен). Предпочтительно вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью исходного полипептида, например от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области, описанный в настоящем документе, предпочтительно будет обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними.

[0058] Антитело «с созревшей аффинностью», такое как антитело к TREM2 с созревшей аффинностью согласно настоящему изобретению, представляет собой антитело с одним или более изменениями в одном или более его HVR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим такого изменения(ий). В одном варианте осуществления антитело с созревшей аффинностью имеет наномолярные или даже пикомолярные значения аффинности к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают с помощью процедур, известных в уровне техники. Например, в Marks et al., *Bio/Technology*, 1992, 10:779-783 описано созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез HVR и/или остатков каркаса описан, например, в Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91:3809-3813; Schier et al. *Gene*, 1995, 169: 147-155; Yelton et al., *Immunol.*, 1995, 155: 1994-2004; Jackson et al., *Immunol.*, 1995, 154(7):3310-9 и Hawkins et al, *J. Mol. Biol.*, 1992, 226:889-896.

[0059] «Аффинность связывания» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между лигандом и его партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания представляет собой внутреннюю аффинность, отражающую взаимодействие один-к-одному между лигандом и партнером по связыванию. Сродство обычно выражают в терминах равновесной ассоциации (K_A) или константы диссоциации (K_D), которые, в свою очередь, представляют собой обратные соотношения констант скорости диссоциации (k_{off}) и скорости ассоциации (k_{on}).

[0060] «Процент (%) идентичности последовательности» и «процент гомологии последовательности» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для

обозначения сравнений между полинуклеотидами или полипептидами, и их определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей сквозь окно сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать пробелы по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент можно рассчитать, определив количество положений, в которых идентичные основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножив результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. В качестве альтернативы процент может быть рассчитан путем определения количества положений, в которых идентичные либо основание нуклеиновой кислоты, либо аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выровнены с промежутком, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. Специалисты в данной области понимают, что существует множество установленных алгоритмов, доступных для выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, 1981, *Adv Appl Math.* 2:482, с помощью алгоритма гомологического выравнивания Needleman and Wunsch, 1970, *J Mol Biol.* 48:443, способом поиска подобия Pearson and Lipman, 1988, *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:2444-8, и, в частности, с помощью компьютеризированного осуществления этих алгоритмов (например, BLAST, ALIGN, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA; см., например, Mount, D.W., *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2013))

[0061] Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются общедоступные алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, FASTDB или ALIGN (например, NCBI: Национальный центр биотехнологической информации). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей. Например, в программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) можно использовать по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепочек. При сравнении аминокислотных последовательностей с использованием BLASTP по умолчанию можно использовать длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу оценок BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:10915-9).

[0062] «Аминокислотная замена» относится к замене одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. «Консервативная аминокислотная замена» относится

к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи, и, таким образом, обычно предусматривает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами из того же или подобного определенного класса аминокислот. В качестве примера и без ограничения аминокислота с алифатической боковой цепью может быть заменена другой алифатической аминокислотой, например аланином, валином, лейцином, изолейцином и метионином; аминокислоту с гидроксильной боковой цепью замещают другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью, например серином и треонином; аминокислоту с ароматическими боковыми цепями замещают другой аминокислотой с ароматическими боковыми цепями, например фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином; аминокислоту с основной боковой цепью замещают другой аминокислотой с основной боковой цепью, например лизином, аргинином и гистидином; аминокислоту с кислой боковой цепью замещают другой аминокислотой с кислой боковой цепью, например аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой; и гидрофобную или гидрофильную аминокислоту замещают другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно.

[0063] «Аминокислотная вставка» относится к включению по меньшей мере одной аминокислоты в предварительно определенную аминокислотную последовательность. Вставка может представлять собой вставку одного или двух аминокислотных остатков; однако в настоящем документе рассматривают более крупные вставки от приблизительно трех до приблизительно пяти или до приблизительно десяти или более аминокислотных остатков.

[0064] «Делеция аминокислоты» относится к удалению одного или более аминокислотных остатков из предварительно определенной аминокислотной последовательности. Делеция может представлять собой удаление одного или двух аминокислотных остатков; однако в настоящем документе рассматривают более крупные делеции от приблизительно трех до приблизительно пяти или до приблизительно десяти или более аминокислотных остатков.

[0065] «Субъект» относится к млекопитающим, в том числе без ограничения людям, приматам, отличным от человека, и животным, отличным от приматов, таким как козы, лошади и коровы. В некоторых вариантах осуществления термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

[0066] «Терапевтически эффективная доза», или «терапевтически эффективное количество», или «эффективная доза» относится к такому количеству соединения, в том числе биологического соединения или фармацевтической композиции, которое достаточно для достижения необходимой активности при введении нуждающемуся в этом млекопитающему. Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное/эффективная количество/доза» в отношении фармацевтических композиций, содержащих антитело, относится к количеству/дозе антитела или фармацевтической композиции на его основе, которые достаточны для получения эффективного ответа при

введении млекопитающему.

[0067] «Фармацевтически приемлемый» относится к соединениям или композициям, которые в целом безопасны, нетоксичны и не являются нежелательными ни с биологической, ни с другой точки зрения, и предусматривает соединение или композицию, которые приемлемы для применения человеком в фармацевтике и ветеринарии. Соединение или композиция могут быть одобрены регулирующим органом или внесены в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для применения у животных, в том числе человека.

[0068] «Фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или вспомогательное средство» относится к вспомогательному веществу, носителю или вспомогательному средству, которые можно вводить субъекту вместе с по меньшей мере одним терапевтическим средством (например, антителом по настоящему изобретению) и который не уничтожает его фармакологическую активность и, как правило, является безопасным, нетоксичным и не является нежелательными ни с биологической, ни с другой точки зрения при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества средства.

[0069] Термин «лечение» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «терапевтический способ» и относится как к 1) терапевтическим способам лечения или мерам, которые излечивают, замедляют, уменьшают симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированных патологических состояний, заболеваний или расстройств, так и к 2) и профилактическим/превентивным мерам. В число лиц, нуждающихся в лечении, могут входить лица, уже страдающие определенным медицинским заболеванием или расстройством, а также лица, которые в конечном итоге могут заболеть этим расстройством (т. е. лица, подверженные риску или нуждающиеся в превентивных мерах).

[0070] Используемый в настоящем документе термин «субъект» или «пациент» относится к любому индивидууму, в отношении которого применяют рассматриваемые способы. Как правило, субъектом является человек, хотя, как это оценят специалисты в данной области, субъектом может быть любое животное.

[0071] В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (BBB). Термин «гематоэнцефалический барьер» или «BBB», используемый в настоящем документе, относится как к собственно BBB, так и к гемато-спинномозговому барьеру. Гематоэнцефалический барьер, состоящий из эндотелия сосудов головного мозга, базальной мембраны и нейроглиальных клеток, действует на ограничение проникновения веществ в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего содержания лекарственного средства в головном мозге/плазме крови составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 после введения (например, перорального или внутривенного введения) пациенту. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего содержания лекарственного средства в головном мозге/плазме крови составляет

по меньшей мере приблизительно 0,03. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего содержания лекарственного средства в головном мозге/плазме крови составляет по меньшей мере приблизительно 0,06. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего содержания лекарственного средства в головном мозге/плазме крови составляет по меньшей мере приблизительно 0,1. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего содержания лекарственного средства в головном мозге/плазме крови составляет по меньшей мере приблизительно 0,2.

[0072] Термин «гомолог», в частности «гомолог TREM», используемый в настоящем документе, относится к любому представителю ряда пептидов или молекул нуклеиновых кислот, обладающих общей биологической активностью, в том числе антигенностью/иммуногенностью, и регуляторной активностью в отношении воспаления и/или структурным доменом и обладающий достаточной идентичностью аминокислотной или нуклеотидной последовательности, как определено в настоящем документе. Гомологи TREM могут происходить как от одного, так и от разных видов животных.

[0073] Используемый в настоящем документе термин «вариант» относится либо к встречающейся в природе аллельной вариации данного пептида, либо к рекомбинантно полученной вариации данного пептида или белка, в которой один или более аминокислотных остатков были модифицированы путем аминокислотной замены, добавления или удаления.

[0074] Используемый в настоящем документе термин «производное» относится к варианту данного пептида или белка, которые модифицированы иным образом, т. е. путем ковалентного присоединения любого типа молекулы, предпочтительно обладающей биологической активностью, к пептиду или белку, в том числе не встречающихся в природе аминокислот.

6.2. Общее описание определенных вариантов осуществления изобретения

[0075] Диагностике, прогнозу и лечению болезни Альцгеймера у пациента в значительной степени способствует идентификация изменений уровней и типов клеток в микроокружении бляшки, паттернов экспрессии наборов генов клеток, ассоциированных с микроокружением бляшки, уровней экспрессии цитокинов, факторов иммунологического ответа или других изменений в микроокружении бляшки, именуемых в настоящем документе в общем «биомаркеры» или, более конкретно, в отношении паттернов экспрессии генов, как «сигнатуры генов», «биомаркеры экспрессии генов» или «молекулярные сигнатуры», или в отношении паттернов экспрессии белков как «белковые сигнатуры», «биомаркеры экспрессии белков» или «протеомные сигнатуры», или в отношении паттернов состава клеточного типа как «клеточные сигнатуры» (т. е. сигнатуры клеток микроглии), которые характерны для болезни Альцгеймера. Такие биомаркеры могут быть связаны с клиническими исходами. Если такая связь позволяет предсказать клинический ответ, то биомаркер преимущественно применяют в способах отбора или стратификации пациентов с большей (или меньшей, в зависимости от обстоятельств) вероятностью пользы от схемы лечения, такой как одна из описанных в

настоящем документе.

[0076] Биологические образцы от пациента с профилями биомаркеров, предсказывающими положительный ответ на лечение, упоминаются в настоящем документе как «положительные в отношении биомаркера» или «высокие в отношении биомаркера». И наоборот, биологические образцы от пациента с профилями биомаркеров, которые не позволяют прогнозировать положительный ответ, упоминаются в настоящем документе как «отрицательные в отношении биомаркера» или «низкие в отношении биомаркера». Альтернативные термины можно использовать в зависимости от биомаркера, но более высокое количество или «высокий в отношении биомаркера» обычно может быть описано с использованием альтернативной терминологии, такой как «положительный в отношении биомаркера» или «биомаркер +», в то время как более низкое количество биомаркера или «низкий в отношении биомаркера» обычно может быть описано с использованием альтернативной терминологии, такой как «отрицательный в отношении биомаркера» или «биомаркер -».

[0077] В некоторых вариантах осуществления биомаркер, используемый в настоящем изобретении, представляет собой панель биомаркеров, такую как панель экспрессии генов. В других вариантах осуществления панель биомаркеров представляет собой панель цитокинов. В других вариантах осуществления панель биомаркеров представляет собой характеристику типов клеток, присутствующих в микроокружении бляшки.

[0078] Такая «панель», используемая в настоящем документе, относится к группе конкретных биомаркеров, например к конкретным генам или популяциям определенных типов клеток в микроокружении бляшки, которые отвечают на определенный стимул (например, лечение пациента агонистом TREM2), таким образом, который имеет тенденцию предсказывать вероятность конкретного клинического исхода. Отдельные биомаркеры, например экспрессия гена или преобладание определенного типа клеток, в панели не обязательно должны отвечать одинаково. Уровень некоторых из них может повышаться, а некоторых может понижаться; соответственно, общий ответ панели, как правило, наиболее полезен для прогнозирования вероятности клинического ответа.

[0079] В некоторых вариантах осуществления биомаркер, используемый в настоящем изобретении, представляет собой сигнатуру гена. В других вариантах осуществления биомаркер представляет собой сигнатуру цитокинов. В других вариантах осуществления панель биомаркеров представляет собой сигнатуру клеточного типа клеток в микроокружении бляшки. Подобно панели, «сигнатура» в настоящем документе относится к группе биомаркеров, таких как определенные гены или популяции определенных типов клеток, присутствующих в микроокружении бляшки, которые реагируют на стимул, чтобы обеспечить отпечаток пальца (отличительный образец) ответа биомаркера на лечение.

[0080] Кроме того, в то время как биомаркеры, полученные от пациентов с болезнью Альцгеймера, являются важным инструментом для улучшения диагностики,

прогноза и лечения болезни Альцгеймера, инвазивность сбора биологических образцов может увеличить риск серьезных осложнений, в том числе анестезиологических катастроф, кровотечения, инфекции, судорог и летального исхода (Warren et al, Brain, 2005). Как хирургическое удаление ткани головного мозга (биопсия), так и аспирация клеток из участков бляшек (тонкоигольная аспирационная цитология) потенциально могут обнажить аномальные клетки в полости черепа. Меньшая инвазивность сбора образцов сыворотки крови для анализа биомаркеров по сравнению с биопсией позволяет более непрерывно контролировать ответ пациента на лечение. Следовательно, минимально инвазивные диагностические инструменты и способы, которые не нарушают целостность черепа или вызывают воспаление, такие как «биомаркеры сыворотки крови», открывают возможности для улучшения ухода за пациентами при одновременном снижении рисков, связанных с текущими схемами лечения. Биомаркеры сыворотки крови предусматривают биомаркеры, которые могут быть получены из образца жидкости организма, полученного вдали от участков бляшек (например, венозной крови и лимфатической жидкости). Примеры биомаркеров сыворотки крови включают, например, циркулирующие цитокины и факторы роста, а также фенотипические и генотипические маркеры в циркулирующих иммунных клетках.

6.3. Биомаркеры, связанные с заболеванием

[0081] Неожиданно было обнаружено, что уровни активации микроглии по отношению к траекториям типов активируемых заболеванием (DAM), интерферон-чувствительных (IFN-R), циклирующих (Cyc-M) и экспрессирующих РНК МНС-II (МНС II) клеток микроглии можно применять в качестве биомаркера в способе, описанном в настоящем документе, таком как способ лечения болезни Альцгеймера у пациента, диагностирования болезни Альцгеймера у пациента или прогнозирования ответа пациента на лечение болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения биомаркер предусматривает статус перехода состояния клеток микроглии. В некоторых вариантах осуществления переход состояния клеток микроглии происходит из гомеостатического состояния. В некоторых вариантах осуществления переход состояния клеток микроглии происходит в сторону траектории типов DAM, IFN-R, Cyc-M или МНС-II клеток микроглии. В некоторых вариантах осуществления определение состояния клеток микроглии осуществляют путем сортировки клеток.

[0082] Ген из профиля экспрессии, характерного для клетки микроглии, подходит в качестве биомаркера в способе, описанном в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из C1QA/B/C, CD81, HEXB, IL1B, LGMN, OLFML3, P2RY12, SPARC, TMEM119, MRC1, PF4, CD3G или MS4A4B. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из C1QA/B/C, CD81, HEXB, IL1B, LGMN, OLFML3, P2RY12, SPARC, TMEM119, MRC1, PF4, CD3G или MS4A4B.

[0083] Любой ген из профиля экспрессии, характерного для конкретной траектории состояния клеток микроглии (например, в отношении типа DAM, Cyc-M, IFN-R или МНС-

II клеток микроглии), подходит в качестве биомаркера в способе, описанном в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген из профиля экспрессии, характерного для траектории DAM микроглии. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из FTL1, MLF, CD63, LPL, CTSB, CST7, APOE, CCL4, CD9 или CCL3. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из Ftl1, MLF, CD63, LPL, CTSB, CST7, APOE, CCL4, CD9 или CCL3. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген из профиля экспрессии, характерного для траектории Сус-М микроглии. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из H2AFZ, HMGB2, TUBA1B, HMGN2, H2AFV, IFI2712A, TUBB5, BIRC5, STMN1 или CCNB2. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из H2AFZ, HMGB2, TUBA1B, HMGN2, H2AFV, IFI2712A, TUBB5, BIRC5, STMN1 или CCNB2. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген из профиля экспрессии, характерного для траектории IFN-R микроглии. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из CCL12, IFITM3, ISG15, IFIT3, BST2, OASL2, LGALS3BP, RTP4, IFI204 или IRF7. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из CCL12, IFITM3, ISG15, IFIT3, BST2, OASL2, LGALS3BP, RTP4, IFI204 или IRF7. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген из профиля экспрессии, характерного для траектории MCH II микроглии. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из H2-K1, H2-Q7, H2-EB1, CD74, H2-AA, H2-D1, H2-AB1, H2-DMA, H2-T23 или LY6E. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из H2-K1, H2-Q7, H2-EB1, CD74, H2-AA, H2-D1, H2-AB1, H2-DMA, H2-T23 или LY6E.

[0084] В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, ассоциированный с путем интерферона. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из BST2, CCL2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IRF7, ISG15, LGALS3BP, OASL2, RTP4, SLFN2 или USP18. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из BST2, CCL2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IRF7, ISG15, LGALS3BP, OASL2, RTP4, SLFN2 или USP18.

[0085] В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, ассоциированный с белковым комплексом MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из B2M, H2-D1, H2-K1, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23 или MR1. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из B2M, H2-D1, H2-K1, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23 или MR1. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, относящийся к белковому

комплексу МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из CD74, H2-AA, H2-AB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-OA или H2-OB. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из CD74, H2-AA, H2-AB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-OA или H2-OB.

[0086] Было обнаружено, что лечение агонистом TREM2 увеличивает уровни CCL4, CCL2, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B и TMEM119 в модели болезни Альцгеймера у животных, уровни которых можно применять в качестве биомаркера в способе, описанном в настоящем документе, таком как способ лечения болезни Альцгеймера у пациента, диагностирования болезни Альцгеймера у пациента или прогнозирования ответа пациента на лечение болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ген, выбранный из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, CXCL10, *IL1B* или *TMEM119*. В других вариантах осуществления биомаркер представляет собой белок или его вариант, кодируемый геном, выбранным из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*.

[0087] Предполагают, что в определенных аспектах настоящего изобретения один или более биомаркеров из того же класса или другого класса биомаркеров (т. е. генные биомаркеры и биомаркеры состояния клеток микроглии) можно применять по отдельности или в любой комбинации друг с другом в качестве панели биомаркеров при применении в способе, описанном в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров содержит один или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более из вышеуказанных биомаркеров повышается после введения агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более из вышеуказанных биомаркеров понижается после введения агониста TREM2.

[0088] В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров предусматривает один или более биомаркеров, выбранных из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B или *TMEM119* повышается после введения агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровень одного, двух, трех, четырех или пяти из одного или более биомаркеров, выбранных из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119* повышается после введения агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровни биомаркеров CCL2, CCL4, CST7, CXCL2 и CXCL10 повышаются после введения

агониста TREM2. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к TREM2 человека.

[0089] Также было обнаружено, что лечение агонистом TREM2 модулирует уровни одного или более биомаркеров, выбранных из тех, которые показаны ниже в таблице А. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из тех, которые указаны в таблице А, повышается после введения агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из тех, что указаны в таблице А, снижается после введения агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления один или более биомаркеров, перечисленных в таблице А, можно измерить вместе с другими биомаркерами по настоящему изобретению любыми способами, предусмотренными в настоящем документе.

Таблица А. Выбранные дополнительные биомаркеры

ABCD1	Arg1	CCL8	CCL19	CCL21	CCR7
CD83	CD86	CD206	CH25H	Chi313	CNTF
CRP	CSF2	CSF3	CST7	FasL	FIZZ1
Fzd1	GM-CSF	HMGB1	IGF1	IFN-a4	IFN- β
IFN- γ	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
IL-11	IL-12	IL-12p40	IL-12P70	IL-17	IL-18
IL-20	IL-22	IL-27	IL-33	LIF	MCP-1
OSM	sTREM2	sCSF1R	TNF	TNF- α	Ym1

[0090] В некоторых вариантах осуществления повышение или снижение уровня биомаркера у пациента представляет собой измеримое повышение или снижение, которое коррелирует с повышенной (или сниженной, в зависимости от обстоятельств) вероятностью терапевтического эффекта для пациента, или для группы пациентов, или пациента, или группы пациентов, которые еще предстоит выбрать. В некоторых вариантах осуществления повышение или уменьшение является статистически значимым повышением или уменьшением. Термин «статистическая значимость» хорошо известен в уровне техники и может быть определен с применением способов, известных в уровне техники, таких как описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления статистическая значимость означает, например, $p < 0,1$, $p < 0,05$, $p < 0,04$, $p < 0,03$, $p < 0,02$ или $p < 0,01$ относительно исходной линии.

[0091] В некоторых вариантах осуществления повышение или снижение уровня биомаркера наблюдают после того, как пациент завершил один цикл лечения. В некоторых вариантах осуществления повышение или уменьшение наблюдают после двух или более циклов лечения, как, например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или 10 или более циклов. Термин «цикл лечения» хорошо известен в уровне техники, и относится к схеме лечения, определенной врачом, которой следует пациент в течение периода времени, такого как 1, 2, 3 или 4 недели, за которым необязательно следует период, например, 1, 2, 3 или 4 недели выздоровления пациента и/или наблюдения за прогрессированием заболевания, в течение которых в некоторых случаях вводят более

низкую дозу терапевтического средства (или вообще не вводят терапевтическое средство). В некоторых вариантах осуществления цикл лечения относится к введению агониста TREM2, такого как hT2AB, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, либо в виде монотерапии, либо в комбинации с другой терапией.

6.4. Способы по настоящему изобретению

[0092] В определенных аспектах настоящего изобретения предложена молекула, которая повышает активность TREM2 (т. е. агониста TREM2), для применения при лечении, профилактике или снижении риска развития состояний, ассоциированных с дефицитом TREM2, у нуждающегося в этом пациента. Состояния или нарушения, ассоциированные с дефицитом TREM2 или утратой функции TREM2, которые можно предупреждать, лечить или облегчать в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают без ограничения болезнь Насу-Хаккола, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, черепно-мозговую травму, повреждение спинного мозга, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, прионную болезнь, инсульт, остеопороз, остеопетроз и остеосклероз. Хотя аспекты определенных способов по настоящему изобретению описаны ниже для пациентов с болезнью Альцгеймера, предполагается, что способы по настоящему изобретению охватывают пациентов с любым из перечисленных выше состояний или нарушений, ассоциированных с дефицитом TREM2 или потерей функции TREM2. Например, способы, описанные ниже, предназначены для охвата пациентов с болезнью Насу-Хаккола, лобно-височной деменцией, рассеянным склерозом, прионной болезнью или инсультом. Таким образом, способы, описанные в настоящем документе для лечения болезни Альцгеймера, также могут быть применены к другому заболеванию, описанному в настоящем документе.

[0093] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ идентификации пациента с болезнью Альцгеймера, который получит пользу от лечения агонистом TREM2, включающий

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(c) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

(е) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18.

[0094] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B или TMEM119. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (е) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[0095] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ идентификации пациента с болезнью Альцгеймера, который, вероятно, получит пользу или имеет повышенную вероятность улучшения по сравнению с другим схожим пациентом, от лечения агонистом TREM2, включающий

(а) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(с) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

(е) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом ответ болезни Альцгеймера на стадию (с) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения болезни Альцгеймера на основании большей

или меньшей степени ответа болезни Альцгеймера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

[0096] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (e) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[0097] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ анализа биологического образца, взятого у пациента *in vitro* или *ex vivo* с определением того, будет ли болезнь Альцгеймера у пациента отвечать или имеет ли повышенную вероятность ответа на лечение агонистом TREM2, включающий

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(c) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2, если пациент с болезнью Альцгеймера ответит или имеет повышенную вероятность ответа на лечение агонистом TREM2.

[0098] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадия (b) дополнительно включает измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[0099] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения болезни Альцгеймера у пациента, который либо не отвечает на предшествующее лечение болезни Альцгеймера, либо у которого болезнь Альцгеймера стала невосприимчивой после первоначального ответа на предшествующее лечение болезни Альцгеймера, включающий:

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-

OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(с) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2, если пациент с болезнью Альцгеймера ответит или имеет повышенную вероятность ответа на лечение агонистом TREM2;

(d) получение второго биологического образца после введения пациенту агониста TREM2 и

(е) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом ответ болезни Альцгеймера на стадию (с) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения болезни Альцгеймера на основании большей или меньшей степени ответа болезни Альцгеймера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

[00100] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (е) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00101] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ прогнозирования того, будет ли болезнь Альцгеймера отвечать на лечение вторым средством лечения болезни Альцгеймера после лечения агонистом TREM2, включающий

(а) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(с) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца после введения пациенту агониста TREM2 и

(e) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом ответ болезни Альцгеймера на стадию (с) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения болезни Альцгеймера на основании большей или меньшей степени ответа болезни Альцгеймера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

[00102] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (e) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00103] В некоторых вариантах осуществления лечение агонистом TREM2 стимулирует микроокружение бляшки, так что бляшка с большей вероятностью будет отвечать на второе терапевтическое средство для лечения болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления бляшка не отвечает на монотерапию при лечении болезни Альцгеймера, но становится стимулированной и отвечает на лечение болезни Альцгеймера в сочетании с агонистом TREM2. В некоторых вариантах осуществления бляшка первоначально отвечает на монотерапию при лечении болезни Альцгеймера, но становится невосприимчивой. В некоторых вариантах осуществления после лечения агонистом TREM2 бляшку можно эффективно лечить при лечении болезни Альцгеймера.

[00104] В некоторых вариантах осуществления указанный выше способ полезен для выявления пациента, которому будет полезно лечение агонистом TREM2. Такой пациент характеризуется тем, что уровень одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, во втором биологическом образце от пациента выше, чем в первом биологическом образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления, когда уровень одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3,

CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, во втором биологическом образце от пациента выше, чем в первом биологическом образце от пациента, то пациенту вводят одну или более дополнительных доз агониста TREM2. Это связано с тем, что считается, что такой пациент вероятно получит пользу от продолжения лечения агонистом TREM2. В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B или TMEM119. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления пациент характеризуется тем, что уровень одного или более дополнительных биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А, также выше во втором биологическом образце, чем в первом биологическом образце.

[00105] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения болезни Альцгеймера агонистом TREM2, включающий

(а) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(с) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца после введения пациенту агониста TREM2 и

(e) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

где если уровень одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9,

CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, во втором биологическом образце от пациента выше, чем в первом биологическом образце от пациента, то пациенту вводят одну или более дополнительных доз агониста TREM2.

[00106] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (e) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00107] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ оценки ответа пациента на агонист TREM2, включающий следующие стадии:

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(c) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца после введения пациенту агониста TREM2 и

(e) измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом ответ болезни Альцгеймера на стадию (c) оценивают для разделения, классификации или стратификации пациента в одну из двух или более групп на основе большего или меньшего ответа бляшки по сравнению с одним или более схожими пациентами.

[00108] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров

выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (e) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00109] В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ прогнозирования ответа пациента на агонист TREM2, включающий следующие стадии:

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце от пациента уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(c) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение второго биологического образца от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

(e) измерение во втором биологическом образце от пациента уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом ответ болезни Альцгеймера на стадию (c) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения на основании большей или меньшей степени ответа болезни Альцгеймера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

[00110] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (e) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00111] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ прогнозирования ответа пациента на лечение болезни Альцгеймера агонистом TREM2, включающий следующие стадии:

(a) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту

агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(c) обработка биологического образца от пациента или эталонного образца;

(d) измерение в обработанном биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(e) сравнение одного или более биомаркеров в биологическом образце до обработки с одним или более биомаркерами в обработанном биологическом образце или обработанном эталонном образце и

(f) необязательно продолжение введения пациенту агониста TREM2, если прогнозируется, что такое введение будет иметь эквивалентную или более высокую вероятность успеха по сравнению с альтернативным способом лечения болезни Альцгеймера;

при этом изменение уровня биомаркера в ответ на стадию (c) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения болезни Альцгеймера на основании большего или меньшего изменения уровня биомаркера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

[00112] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (d) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00113] В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получен от другого пациента, такого как пациент со схожей патологией, представляющей собой болезнь Альцгеймера; или эталонный образец может представлять собой культуру или другой образец *in vitro* схожей патологии, представляющей собой болезнь Альцгеймера.

[00114] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ

мониторинга ответа пациента на агонист TREM2, включающий следующие стадии:

(а) получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

(b) измерение в первом биологическом образце от пациента уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(с) введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

(d) получение одного или более последующих биологических образцов от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

(е) измерение в последующих биологических образцах уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом уровни одного или более биомаркеров в первом биологическом образце и последующих биологических образцах поддаются сравнению, и изменения в уровне одного или более биомаркеров указывают на степень ответа пациента.

[00115] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления стадии (b) и (е) дополнительно включают измерение уровня одного или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00116] В некоторых вариантах осуществления ответ пациента на агонист TREM2 измеряют один раз в неделю или каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления ответ пациента измеряют один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления ответ пациента измеряют раз в два месяца. В некоторых вариантах осуществления ответ пациента измеряют каждый квартал (один раз в три месяца). В некоторых вариантах осуществления ответ пациента измеряют ежегодно.

[00117] В некоторых вариантах осуществления ответ пациента на агонист TREM2 отслеживают во время прохождения лечения. В некоторых вариантах осуществления ответ пациента отслеживают после завершения лечения.

[00118] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ

получения сигнатуры биомаркеров, позволяющей прогнозировать ответ на лечение агонистом TREM2, включающий

(a) получение биологического образца перед лечением от каждого пациента в когорте пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера;

(b) получение для каждого пациента в когорте значения ответа после лечения агонистом TREM2;

(c) измерение исходных уровней биомаркеров в каждом биологическом образце для каждого гена на платформе биомаркеров, при этом платформа биомаркеров содержит набор биомаркеров клинического ответа из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

(d) нормализацию для каждого биологического образца каждого из измеренных исходных уровней биомаркеров для биомаркеров клинического ответа с использованием измеренных уровней биомаркеров набора биомаркеров в нормальном состоянии и

(e) сравнение уровней биомаркеров для всех биологических образцов и значений ответа для всех пациентов в когорте, чтобы выбрать пороговое значение для показателя сигнатуры биомаркеров, которое делит когорту пациентов, чтобы соответствовать критерию клинической полезности биомаркера-мишени.

[00119] В некоторых вариантах осуществления платформа биомаркеров предусматривает платформу экспрессии генов, которая содержит набор генов клинического ответа. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает следующие стадии:

(f) взвешивание для каждого биологического образца и каждого биомаркера, такого как ген в представляющей интерес сигнатуре гена, нормализованных уровней экспрессии биомаркера (например, биомаркера РНК) с использованием предварительно определенного коэффициента мультипликации для этого гена;

(g) добавление для каждого пациента взвешенных уровней экспрессии биомаркера (например, биомаркера РНК) для получения показателя сигнатуры биомаркеров, например показатель сигнатуры гена, для каждого пациента в когорте.

[00120] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления платформа биомаркеров дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00121] В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ тестирования биологического образца от пациента в отношении наличия или отсутствия

биомаркера генной сигнатуры ответа болезни Альцгеймера на агонист TREM2, включающий

(a) измерение уровня исходной РНК в биологическом образце для каждого гена в платформе генной экспрессии, при этом платформа генной экспрессии содержит набор генов клинического ответа, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, и набор генов нормализации генов «домашнего хозяйства» и, необязательно, при этом приблизительно 80% или приблизительно 90% генов клинического ответа демонстрируют уровни РНК, которые положительно коррелируют с ответом болезни Альцгеймера;

(b) нормализацию измеренного исходного уровня РНК для каждого гена клинического ответа в предварительно определенной сигнатуре гена для биологического образца с использованием измеренных уровней РНК генов нормализации, при этом предварительно определенная сигнатура гена состоит по меньшей мере из 2 генов клинического ответа, таким образом получая показатель сигнатуры гена;

(c) сравнение показателя сигнатуры гена с эталонным показателем сигнатуры гена и

(d) классификацию биологического образца как высокого в отношении биомаркера или низкого в отношении биомаркера;

при этом, если сгенерированный показатель равен или больше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как высокий в отношении биомаркера, а если сгенерированный показатель меньше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как низкий в отношении биомаркера.

[00122] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления платформа экспрессии генов дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00123] В некоторых вариантах осуществления после стадии (b) способ включает следующие стадии:

(i) взвешивание каждого нормализованного значения РНК с использованием предварительно определенного коэффициента мультипликации;

(ii) добавление взвешенных уровней экспрессии РНК для получения взвешенного показателя сигнатуры генов.

[00124] В некоторых вариантах осуществления набор генов нормализации включает приблизительно от 1 до 5 генов «домашнего хозяйства», от 5 до 10 генов

«домашнего хозяйства», от 10 до приблизительно 20 генов «домашнего хозяйства» или приблизительно 30-40 генов «домашнего хозяйства».

[00125] В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ тестирования биологического образца от пациента с диагностированной болезнью Альцгеймера в отношении наличия или отсутствия биомаркеров ответа болезни Альцгеймера на агонист TREM2, включающий

(a) измерение уровня исходного биомаркера в биологическом образце для каждого биомаркера на платформе биомаркеров, при этом платформа биомаркеров содержит набор биомаркеров клинического ответа, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, и набор биомаркеров нормализации, и при этом необязательно приблизительно 80% или приблизительно 90% биомаркеров клинического ответа демонстрируют уровни, которые положительно коррелируют с ответом болезни Альцгеймера;

(b) нормализацию измеренного исходного уровня биомаркера для каждого биомаркера клинического ответа в предварительно определенной сигнатуре биомаркера для биологического образца с использованием измеренных уровней биомаркеров нормализации биомаркеров, при этом предварительно определенная сигнатура биомаркеров состоит из по меньшей мере 2 биомаркеров клинического ответа;

(c) сравнение нормализованных уровней биомаркеров и набора эталонных уровней биомаркеров для биологического образца и

(d) классификацию биологического образца как высокого в отношении биомаркера или низкого в отношении биомаркера;

при этом, если нормализованные уровни биомаркеров равны эталонным уровням биомаркеров или превышают их, то биологический образец классифицируют как высокий в отношении биомаркера, а если нормализованные уровни биомаркеров ниже эталонных уровней биомаркеров, то биологический образец классифицируют как низкий в отношении биомаркера.

[00126] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления платформа биомаркеров дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00127] В некоторых вариантах осуществления набор биомаркеров нормализации включает от приблизительно 10 до приблизительно 12 генов «домашнего хозяйства» или приблизительно 30-40 генов «домашнего хозяйства».

[00128] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает систему для тестирования образца биологического образца, взятого у пациента, страдающего болезнью Альцгеймера, в отношении наличия или отсутствия сигнатуры биомаркеров ответа на агонист TREM2, включающую

(i) анализатор образцов для измерения исходных уровней биомаркеров на платформе биомаркеров, при этом платформа биомаркеров состоит из набора биомаркеров клинического ответа, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18; и набор биомаркеров нормализации; и

(ii) компьютерную программу для получения и анализа измеренных уровней биомаркеров с целью

(a) нормализовать измеренный уровень исходных биомаркеров для каждого биомаркера клинического ответа в предварительно определенной сигнатуре биомаркеров для биологического образца с использованием измеренных уровней биомаркеров нормализации;

(b) сравнить сгенерированный уровень биомаркеров с эталонным уровнем для сигнатуры биомаркеров и

(c) классифицировать биологический образец как высокий в отношении биомаркера или низкий в отношении биомаркера, при этом, если сгенерированный показатель равен или больше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как высокий в отношении биомаркера, а если сгенерированный показатель меньше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как низкий в отношении биомаркера.

[00129] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления платформа биомаркеров дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00130] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает систему для тестирования биологического образца от пациента с диагностированной болезнью Альцгеймера в отношении наличия или отсутствия сигнатуры биомаркеров ответа болезни Альцгеймера на агонист TREM2, включающую

(i) анализатор образцов для измерения исходных уровней биомаркеров на платформе биомаркеров, при этом платформа биомаркеров состоит из набора биомаркеров клинического ответа, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C,

CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18; и набор биомаркеров нормализации; и

(ii) компьютерную программу для получения и анализа измеренных уровней биомаркеров с целью

(a) нормализовать измеренный уровень исходных биомаркеров для каждого биомаркера клинического ответа в предварительно определенной сигнатуре биомаркеров для биологического образца с использованием измеренных уровней биомаркеров нормализации;

(b) взвесить каждый нормализованный уровень биомаркеров с использованием предварительно определенного коэффициента мультипликации;

(c) добавить взвешенные уровни биомаркеров для генерирования показателя сигнатуры биомаркеров;

(d) сравнить сгенерированный показатель с эталонным показателем для сигнатуры биомаркеров и

(e) классифицировать биологический образец как высокий в отношении биомаркера или низкий в отношении биомаркера, при этом, если сгенерированный показатель равен или больше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как высокий в отношении биомаркера, а если сгенерированный показатель меньше эталонного показателя, то биологический образец классифицируют как низкий в отношении биомаркера.

[00131] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления платформа биомаркеров дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00132] В некоторых вариантах осуществления биомаркер предусматривает уровень экспрессии РНК гена, описанного в настоящем документе, например APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18. В определенных вариантах осуществления биомаркер дополнительно предусматривает уровень экспрессии РНК одного или более генов, перечисленных в таблице А. В определенных вариантах

осуществления один или более биомаркеров выбраны из *Ccl2*, *Ccl4*, *Cxcl10*, *Cst7* или *Tmem119*.

[00133] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает набор для анализа биологического образца от пациента с болезнью Альцгеймера, получавшего лечение агонистом TREM2, с получением нормализованных показателей экспрессии РНК для генной сигнатуры, ассоциированной с микроокружением бляшки, при этом набор содержит

(a) набор гибридизационных зондов, способных специфически связываться с транскриптом, экспрессируемым каждым из генов и

(b) набор реагентов, предназначенных для количественного определения численности специфических комплексов гибридизации, образованных с каждым зондом гибридизации.

[00134] В некоторых вариантах осуществления сигнатура гена выбрана из двух или более из *APOE*, *B2M*, *BIRC5*, *BST2*, *C1QA/B/C*, *CCL12*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCNB2*, *CD3G*, *CD63*, *CD74*, *CD81*, *CD9*, *CST7*, *CTSB*, *CXCL10*, *CXCL2*, *FTL1*, *H2-AA*, *H2-AB1*, *H2AFV*, *H2AFZ*, *H2-D1*, *H2-DMA*, *H2-DMB1*, *H2-DMB2*, *H2-EB1*, *H2-K1*, *H2-OA*, *H2-OB*, *H2-Q10*, *H2-Q4*, *H2-Q6*, *H2-Q7*, *H2-T23*, *HEXB*, *HMGB2*, *HMG2*, *IFI204*, *IFI2712A*, *IFIT3*, *IFITM3*, *IL1B*, *IRF7*, *ISG15*, *LGALS3BP*, *LGMN*, *LPL*, *LY6E*, *MLF*, *MR1*, *MRC1*, *MS4A4B*, *OASL2*, *OLFML3*, *P2RY12*, *PF4*, *RTP4*, *SLFN2*, *SPARC*, *STMN1*, *TMEM119*, *TUBA1B*, *TUBB5* или *USP18*. В некоторых вариантах осуществления сигнатура генов дополнительно содержит один или более биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00135] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2.

[00136] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения пациента, страдающего болезнью Альцгеймера, включающий определение того, является ли биологический образец пациента положительным или отрицательным в отношении биомаркера, такого как биомаркер сигнатуры гена, и введение пациенту агониста TREM2, если биологический образец является положительным в отношении биомаркера, и введение субъекту лечения болезни Альцгеймера, которое не предусматривает агонист TREM2, если биологический образец от пациента является отрицательным в отношении биомаркера, при этом биомаркер, такой как биомаркер сигнатуры гена, предназначен для биомаркера, например биомаркер сигнатуры гена, который предусматривает по меньшей мере два биомаркера клинического ответа, выбранные из *APOE*, *B2M*, *BIRC5*, *BST2*, *C1QA/B/C*, *CCL12*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCNB2*, *CD3G*, *CD63*, *CD74*, *CD81*, *CD9*, *CST7*, *CTSB*, *CXCL10*, *CXCL2*, *FTL1*, *H2-AA*, *H2-AB1*, *H2AFV*, *H2AFZ*, *H2-D1*, *H2-DMA*, *H2-DMB1*, *H2-DMB2*, *H2-EB1*, *H2-K1*, *H2-OA*, *H2-OB*, *H2-Q10*, *H2-Q4*, *H2-Q6*, *H2-Q7*, *H2-T23*, *HEXB*, *HMGB2*, *HMG2*, *IFI204*, *IFI2712A*, *IFIT3*, *IFITM3*, *IL1B*, *IRF7*, *ISG15*, *LGALS3BP*, *LGMN*, *LPL*, *LY6E*, *MLF*, *MR1*, *MRC1*, *MS4A4B*, *OASL2*, *OLFML3*, *P2RY12*, *PF4*, *RTP4*, *SLFN2*, *SPARC*, *STMN1*, *TMEM119*, *TUBA1B*, *TUBB5* или *USP18*. В некоторых вариантах

осуществления мультигенный показатель сигнатуры, такой как показатель сигнатуры *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*, можно применять как один «биомаркер» в той же группе, что и биомаркеры других отдельных генов, для расчета более предсказуемого показателя сигнатуры генов. В некоторых вариантах осуществления биомаркеры клинического ответа дополнительно содержат один или более биомаркеров, перечисленных в таблице А.

[00137] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ тестирования биологического образца от пациента для получения показателя сигнатуры для сигнатуры гена, который коррелирует с ответом болезни Альцгеймера на агонист TREM2, где способ включает

(а) измерение исходного уровня РНК в биологическом образце для каждого гена в сигнатуре гена и для каждого гена в наборе нормализации генов, при этом сигнатура гена содержит гены, выбранные из *APOE*, *B2M*, *BIRC5*, *BST2*, *C1QA/B/C*, *CCL12*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCNB2*, *CD3G*, *CD63*, *CD74*, *CD81*, *CD9*, *CST7*, *CTSB*, *CXCL10*, *CXCL2*, *FTL1*, *H2-AA*, *H2-AB1*, *H2AFV*, *H2AFZ*, *H2-D1*, *H2-DMA*, *H2-DMB1*, *H2-DMB2*, *H2-EB1*, *H2-K1*, *H2-OA*, *H2-OB*, *H2-Q10*, *H2-Q4*, *H2-Q6*, *H2-Q7*, *H2-T23*, *HEXB*, *HMGB2*, *HMGN2*, *IFI204*, *IFI2712A*, *IFIT3*, *IFITM3*, *IL1B*, *IRF7*, *ISG15*, *LGALS3BP*, *LGMN*, *LPL*, *LY6E*, *MLF*, *MR1*, *MRC1*, *MS4A4B*, *OASL2*, *OLFML3*, *P2RY12*, *PF4*, *RTP4*, *SLFN2*, *SPARC*, *STMN1*, *TMEM119*, *TUBA1B*, *TUBB5* или *USP18*;

(b) нормализацию измеренного исходного уровня РНК для каждого гена в сигнатуре гена с использованием измеренных уровней РНК генов нормализации;

(c) умножение каждого нормализованного значения РНК на вычисленный весовой коэффициент, установленный для получения взвешенного значения экспрессии РНК; и

(d) добавление взвешенных значений экспрессии РНК для получения показателя сигнатуры гена.

[00138] В определенных вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из *CCL2*, *CCL4*, *CST7*, *CXCL2*, *CXCL10*, *IL1B* или *TMEM119*. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2.

[00139] В некоторых вариантах осуществления мультигенный показатель сигнатуры, такой как показатель сигнатуры интерферона, можно использовать как один «биомаркер» в той же группе, что и биомаркеры других отдельных генов, для расчета более предсказуемого показателя сигнатуры генов.

[00140] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стадия измерения включает выделение РНК из биологического образца пациента и инкубацию образца с набором зондов, которые разработаны для специфической гибридизации с целевыми областями РНК гена. В некоторых вариантах осуществления анализируют первый биологический образец от пациента и/или второй биологический образец от пациента *in vitro* или *ex vivo*.

[00141] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов способ дополнительно включает измерение уровня одного или более

дополнительных биомаркеров или уровня экспрессии гена, в соответствии со способом, выбранным из перечисленных в таблице А. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления во время любой стадии, на которой измеряют уровень биомаркера, указанная стадия необязательно дополнительно включает измерение уровня одного или более дополнительных биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А. В некоторых вариантах осуществления способ необязательно дополнительно включает измерение уровня двух или более дополнительных биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А. В некоторых вариантах осуществления способ необязательно дополнительно включает измерение уровня трех или более дополнительных биомаркеров, выбранных из перечисленных в таблице А.

[00142] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ индуцирования активации микроглии у пациента в направлении траекторий специфического типа клеток микроглии, включающий введение пациенту эффективного количества агониста TREM2. В некоторых вариантах осуществления активация микроглии направлена по траектории типа микроглии, ассоциированной с заболеванием (DAM). В некоторых вариантах осуществления активация микроглии направлена по траектории типа микроглии, чувствительной к интерферону (IFN-R). В некоторых вариантах осуществления активация микроглии направлена по траектории типа циклирующей (Cyc-M) микроглии. В некоторых вариантах осуществления активация микроглии направлена по траектории типа экспрессирующей МНС-II (MHC-II) микроглии. В некоторых вариантах осуществления у пациента диагностирована болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2.

6.5. Мишени для связывания

[00143] Настоящее изобретение направлено на применение терапевтических молекул, которые специфически связываются с TREM2, в частности с TREM2 человека. TREM2 является представителем Ig-суперсемейства рецепторов, который экспрессируется клетках миелоидной линии дифференцировки, в том числе макрофагах, дендритных клетках и микроглие (Schmid et al., *Journal of Neurochemistry*, Vol. 83: 1309-1320, 2002; Colonna, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 3: 445-453, 2003; Kiialainen et al., *Neurobiology of Disease*, 2005, 18: 314-322). TREM2 представляет собой иммунный рецептор, который связывает многие эндогенные субстраты, в том числе ApoE, LPS, экспонированные фосфолипиды, фосфатидилсерин и бета-амилоид, и передает сигнал через короткий внутриклеточный домен, который образует комплексы с адапторным белком DAP12, цитоплазматический домен которого содержит мотив ITAM (Bouchon et al., *The Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194: 1111-1122). При активации TREM2 остатки тирозина в мотиве ITAM в DAP12 фосфорилируются киназами семейства Src, обеспечивая позиции стыковки для белка 70, ассоциированного с ζ -цепью тирозинкиназы (ZAP70), и тирозинкиназы селезенки (Syk) через их домены SH2 (Colonna, *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3:445-453; Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, 2016, 7:420-427).

Киназы ZAP70 и Syk индуцируют активацию нескольких нисходящих сигнальных каскадов, в том числе фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), протеинкиназы С (PKC), внеклеточной регулируемой киназы (ERK), и повышение уровня внутриклеточного кальция (Colonna, *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3:445-453; Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, 2016, 7:420-427).

[00144] TREM2 участвует в некоторых процессах, связанных с миелоидными клетками, в том числе фагоцитозе, пролиферации, выживании и регуляции продуцирования воспалительных цитокинов (Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, 2016, 7: 420-427). В последние несколько лет TREM2 связывают с несколькими заболеваниями. Например, мутации как в TREM2, так и в DAP12 связаны с аутосомно-рецессивным нарушением под названием болезнь Насу-Хакола, которое характеризуется костными кистами, атрофиями мышц и демиелинизацией (Guerreiro et al., *New England Journal of Medicine*, 2013, 368: 117-127). В последнее время варианты в гене TREM2 связаны с повышенным риском развития болезни Альцгеймера (AD) и других форм деменции, в том числе лобно-височной деменции и бокового амиотрофического склероза (Jonsson et al., *New England Journal of Medicine*, 2013, 368:107-116; Guerreiro et al., *JAMA Neurology*, 2013, 70:78-84; Jay et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2015, 212: 287-295; Cady et al., *JAMA Neurol.* 2014 Apr;71(4):449-53). В частности, вариант R47H идентифицировали в исследованиях по всему геному как ассоциированный с повышенным риском AD с поздним началом с общим скорректированным отношением шансов (для популяций всех возрастов), составляющим 2,3, уступая только сильной генетической ассоциации ApoE с болезнью Альцгеймера. Мутация R47H находится на внеклеточном V-образном Ig-домене белка TREM2 и, как было показано, влияет на связывание липидов и поглощение апоптотических клеток и Aβeta (Wang et al., *Cell*, 2015, 160: 1061-1071; Yeh et al., *Neuron*, 2016, 91: 328-340), что свидетельствует о потере функции, связанной с заболеванием. Кроме того, посмертное сравнение мозга пациентов с AD с мутацией R47H и без нее подтверждает данные о ранее неизученной потере барьерной функции микроглии для носителей мутации, при этом микроглия-носитель R47H предположительно демонстрирует сниженную способность уплотнять бляшки и ограничивать их распространение (Yuan et al., *Neuron*, 2016, 90: 724-739). На животных моделях прионных заболеваний, рассеянного склероза и инсульта сообщали о нарушении в микроглиозе, что позволяет предположить, что TREM2 может играть важную роль в поддержке микроглиоза в ответ на патологию или повреждение в центральной нервной системе (Ulrich and Holtzman, *ACS Chem. Neurosci.*, 2016, 7: 420-427).

[00145] У людей ген TREM2 расположен в кластере генов TREM в хромосоме 6p21.1. Кластер генов TREM кодирует четыре белка TREM (TREM1, TREM2, TREM4 и TREM5), а также два TREM-подобных белка (TLT-1 и TLT-2). Ген TREM2 кодирует белок из 230 аминокислот, состоящий из внеклеточного домена, трансмембранной области и короткого цитоплазматического хвоста (Paradowska-Gorycka et al., *Human Immunology*, Vol. 74: 730-737, 2013). Внеклеточный домен содержит один домен суперсемейства Ig

типа V с тремя потенциальными сайтами N-гликозилирования. Аминокислотная последовательность hTREM2 дикого типа из 230 аминокислот (эталонная последовательность в NCBI: NP_061838.1) представлена ниже как SEQ ID NO:1.

1
MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYSMKHWGRRKAWCRQLGEK
GPC
61
QRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEAD
T
121
LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLA
181 CIFLIKILAAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPLGLRDT
(SEQ ID NO:1)

[00146] Аминокислоты с 1 по 18 белка TREM2 человека дикого типа (SEQ ID NO:1) представляют собой сигнальный пептид, который обычно удаляется из зрелого белка. Зрелый белок TREM2 человека содержит внеклеточный домен в пределах аминокислот 19-174 из SEQ ID NO:1, трансмембранный домен в пределах аминокислот 175-195 из SEQ ID NO:1 и цитоплазматический домен в пределах аминокислот 196-230 из SEQ ID NO:1. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена (в том числе сигнальный пептид) TREM2 человека представлена ниже под SEQ ID NO:2.

1
MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYSMKHWGRRKAWCRQLGEK
GPC
61
QRWSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADT
121
LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTS
(SEQ ID NO:2)

[00147] Термин «триггерный рецептор человека, экспрессируемый на миелоидных клетках-2» или «TREM2 человека» может относиться к полипептиду под SEQ ID NO:1, полипептиду под SEQ ID NO:2, полипептидам под SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 минус сигнальный пептид (аминокислоты 1-18), аллельным вариантам TREM2 человека или сплайсированным вариантам TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления термин «TREM2 человека» предусматривает встречающиеся в природе варианты TREM2, такие как с мутациями R47H, Q33X (X представляет собой стоп-кодон), Y38C, T66M, D87N, H157Y, R98W и S116C.

[00148] Поскольку цитоплазматический домен TREM2 не обладает сигнальной способностью, то он должен взаимодействовать с другими белками для трансдукции TREM2-активирующих сигналов. Одним из таких белков является DNAX-активирующий белок размером 12 кДа (DAP12). DAP12 также известен как белок, ассоциированный с

рецептором, активирующим киллерные клетки (KARAP), и белок, связывающий тирозинкиназы (TYROBP). DAP12 является трансмембранным адаптерным белком I типа, который содержит мотив ITAM в его цитоплазматическом домене. Мотив ITAM опосредует распространение сигнала путем активации тирозинкиназ ZAP70 и Syk, которые в свою очередь активируют несколько нисходящих сигнальных каскадов, в том числе P13K, PKC, ERK, и повышение уровня внутриклеточного кальция (Colonna, Nature Reviews Immunology, Vol. 3: 445-453, 2003; Ulrich and Holtzman, ACS Che Neurosci., Vol. 7: 420-427, 2016). DAP12 и TREM2 ассоциируются посредством их трансмембранных доменов; заряженный остаток лизина в трансмембранном домене TREM2 взаимодействует с заряженным остатком аспарагиновой кислоты в трансмембранном домене DAP12.

[00149] DAP12 человека кодируется геном TYROBP, расположенным на хромосоме 19q13.1. Белок человека имеет длину 113 аминокислот и включает лидерную последовательность (аминокислоты 1-27 из SEQ ID NO:3), короткий внеклеточный домен (аминокислоты 28-41 из SEQ ID NO:3), трансмембранный домен (аминокислоты 42-65 из SEQ ID NO:3) и цитоплазматический домен (аминокислоты 66-113 из SEQ ID NO:3) (Paradowska-Gorycka et al, Human Immunology, Vol. 74: 730-737, 2013). DAP12 образует гомодимер с помощью двух остатков цистеина в коротком внеклеточном домене. Аминокислотная последовательность DAP12 дикого типа человека (эталонная последовательность в NCBI: NP_003323.1) представлена ниже как SEQ ID NO:3.

1

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIAL
A

61 VYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY
(SEQ ID NO:3)

[00150] Термин «DAP12 человека» может относиться к полипептиду под SEQ ID NO:3, полипептиду под SEQ ID NO:3 минус лидерный пептид (аминокислоты 1-27), аллельным вариантам DAP12 человека или сплайсированным вариантам DAP12 человека.

6.6. Способы лечения по настоящему изобретению

[00151] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения заболевания или расстройства, вызванных и/или ассоциированных с дисфункцией TREM2 у пациента-человека, при этом способ включает введение пациенту молекулы, повышающей активность TREM2. В некоторых вариантах осуществления молекула, повышающая активность TREM2, представляет собой агонист TREM2. В некоторых вариантах осуществления агонистом TREM2 является антитело к hTREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления молекула, повышающая активность TREM2, представляет собой молекулу, которая предупреждает деградацию TREM2. В некоторых вариантах осуществления молекула, повышающая активность TREM2, представляет собой антитело к hTREM2 или его антигенсвязывающий

фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекула, повышающая активность TREM2, представляет собой малую молекулу.

[00152] В некоторых вариантах осуществления введение агониста TREM2 активирует сигнальные пути DAP12 у пациента, что приводит к увеличению пролиферации микроглии, выживаемости микроглии и/или фагоцитозу микроглии. В некоторых вариантах осуществления введение агониста TREM2 приводит к замедлению прогрессирования заболевания.

[00153] В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2 активирует передачу сигналов TREM2/DAP12 в миелоидных клетках, в том числе моноцитах, дендритных клетках, клетках микроглии и/или макрофагах. В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2 активирует, индуцирует, способствует, стимулирует или иным образом усиливает один или более видов активности TREM2. Активность TREM2, которая активируется или усиливается агонистом, предусматривает без ограничения связывание TREM2 с DAP12; связывание DAP12 с TREM2; фосфорилирование TREM2, фосфорилирование DAP12; активация PI3K; повышенные уровни растворимого TREM2 (sTREM2); повышенные уровни растворимого CSF1R (sCSF1R); повышенный уровень экспрессии одного или более противовоспалительных медиаторов (например, цитокинов), выбранных из группы, состоящей из IL-12p70, IL-6 и IL-10; сниженный уровень экспрессии одного или более провоспалительных медиаторов, выбранных из группы, состоящей из IFN- α 4, IFN- β , IL-6, IL-12 p70, IL-1 β , TNF, TNF- α , IL-10, IL-8, CRP, представителей TGF-бета семейств хемокиновых белков, представителей семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, TGF-бета, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 и CRP; повышенный уровень экспрессии одного или более хемокинов, выбранных из группы, состоящей из CCL2, CCL4, CXCL10, CXCL2, CST7; сниженный уровень экспрессии TNF- α , IL-6 или обоих; фосфорилирование внеклеточной регулируемой сигналом киназы (ERK); повышенный уровень экспрессии хемокинового С-С рецептора 7 (CCR7); индукцию хемотаксиса клеток микроглии по отношению к клеткам, экспрессирующим CCL19 и CCL21; увеличение, нормализацию или и то, и другое способности дендритных клеток костного мозга индуцировать пролиферацию антигенспецифических Т-клеток; индукцию продуцирования остеокластов, повышение скорости остеокластогенеза или и то, и другое; повышение уровня выживаемости и/или функции одной или более из дендритных клеток, макрофагов, клеток микроглии, M1 макрофагов и/или клеток микроглии, активированных M1 макрофагов и/или клеток микроглии, M2 макрофагов и/или клеток микроглии, моноцитов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и клеток Купфера; индукцию одного или более типов клиренса, выбранных из группы, состоящей из апоптотического клиренса нейронов, клиренса остатков нервной ткани, клиренса отличных от нервной тканей, клиренса бактерий или других инородных тел, клиренса болезнетворных белков, клиренса болезнетворных пептидов и клиренса болезнетворной нуклеиновой кислоты; индукцию фагоцитоза одного или более апоптотических нейронов, остатков нервной ткани, остатков отличных от нервной тканей, бактерий, других

инородных тел, болезнетворных белков, болезнетворных пептидов или болезнетворных нуклеиновых кислот; нормализацию нарушенной зависимой от TREM2/DAP12 экспрессии гена; рекрутирование Syk, ZAP70 или обоих в комплекс TREM2/DAP12; фосфорилирование Syk; повышенный уровень экспрессии CD83 и/или CD86 на дендритных клетках, макрофагах, моноцитах и/или микроглии; снижение уровня секреции одного или более воспалительных цитокинов, выбранных из группы, состоящей из TNF- α , IL-10, IL-6, MCP-1, IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , IL-8, CRP, представителей TGF-бета семейств хемокиновых белков, представителей семейства IL-20, IL-33, LIF, IFN-гамма, OSM, CNTF, TGF-бета, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, и CRP; сниженный уровень экспрессии одного или более воспалительных рецепторов; повышение степени фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией в условиях сниженного уровня MCSF; снижение уровня фагоцитоза макрофагами, дендритными клетками, моноцитами и/или микроглией при нормальных уровнях MCSF; повышение активности одного или более зависимых от TREM2 генов или любую их комбинацию.

[00154] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает агонист TREM2 для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, вызванного дисфункцией TREM2 и/или ассоциированного с ней.

6.7. Заболевания и расстройства

[00155] В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрен агонист TREM2 для применения при лечении, предупреждении или снижении риска развития состояний, ассоциированных с дефицитом TREM2, у нуждающегося в этом пациента. В конкретных вариантах осуществления применение предусматривает введение пациенту эффективного количества агониста TREM2.

[00156] Состояния или нарушения, ассоциированные с дефицитом TREM2 или утратой функции TREM2, которые можно предупреждать, лечить или облегчать в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают без ограничения болезнь Насу-Хакола, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, черепно-мозговую травму, повреждение спинного мозга, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, прионную болезнь, инсульт, остеопороз, остеопетроз и остеосклероз. В определенных вариантах осуществления состояние или нарушение, которое подлежит предупреждению, лечению или облегчению в соответствии со способами по настоящему изобретению, представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Насу-Хакола, лобно-височную деменцию, рассеянный склероз, прионную болезнь или инсульт.

[00157] В некоторых вариантах состояние, подлежащее лечению, предупреждению или облегчению, представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят антигенсвязывающий белок-агонист TREM2, является пациентом с риском развития болезни Альцгеймера. Может быть определено, что пациент, нуждающийся в лечении, характеризуется одним или более генотипами,

ассоциированными с повышенным риском развития заболевания или состояния, которое можно лечить в соответствии со способами по настоящему изобретению. Например, в некоторых вариантах осуществления пациент характеризуется генотипом, ассоциированным с повышенным риском развития болезни Альцгеймера, таким как генотипы, описанные в настоящем документе. В дополнительных вариантах осуществления пациент может быть определен как носитель аллеля, кодирующего вариант TREM2, связанный с повышенным риском развития болезни Альцгеймера. Например, в одном варианте осуществления определено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs75932628-T в гене TREM2, например у пациента наблюдался генотип СТ при rs75932628. В родственных вариантах осуществления пациент, страдающий болезнью Альцгеймера или с риском развития болезни Альцгеймера является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует гистидин вместо аргинина в положении 47 в SEQ ID NO:1 (вариант TREM2 с R47H). В других вариантах осуществления определено, что пациент имеет по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs143332484-T в гене TREM2, например у пациента наблюдался генотип СТ при rs143332484. В родственных вариантах осуществления пациент, страдающий болезнью Альцгеймера или с риском развития болезни Альцгеймера является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует гистидин вместо аргинина в положении 62 в SEQ ID NO:1 (вариант TREM2 с R62H). В некоторых вариантах осуществления установлено, что у пациента с риском развития болезни Альцгеймера имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs6910730-G в гене TREM1, по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs7759295-C перед геном TREM2, и/или по меньшей мере один ε4-аллель гена APOE.

[00158] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, лечения или ослабления лобно-височной деменции или болезни Насу-Хаккола у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка-агониста TREM2, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят антигенсвязывающий белок-агонист TREM2, является пациентом с риском развития лобно-височной деменции или болезни Насу-Хаккола. Например, в одном таком варианте осуществления установлено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs104894002-A в гене TREM2, например у пациента наблюдался генотип GA или AA при rs104894002. В родственных вариантах осуществления пациент с риском развития лобно-височной деменции или болезни Насу-Хаккола является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует усеченный белок TREM2 в результате замены стоп-кодона вместо глутамина в положении 33 в SEQ ID NO:1. В другом варианте осуществления определено, что у пациента имеется по меньшей мере один аллель, содержащий мутацию rs201258663-A в гене TREM2, например у пациента наблюдался генотип GA или AA при rs201258663. В родственных

вариантах осуществления пациент с риском развития лобно-височной деменции или болезни Насу-Хакола является пациентом, у которого определено наличие любого аллеля варианта TREM2, который кодирует метионин вместо треонина в положении 66 в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления пациент с риском развития лобно-височной деменции или болезни Насу-Хакола является пациентом, у которого определено наличие аллеля варианта TREM2, который кодирует цистеин вместо тирозина в положении 38 в SEQ ID NO:1.

[00159] В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения, лечения или облегчения рассеянного склероза у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту эффективного количества агониста TREM2, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пациент, которому вводят агонист TREM2, является пациентом с риском развития рассеянного склероза.

[00160] Настоящее изобретение также включает способы повышения уровня выживаемости или пролиферации миелоидных клеток, таких как макрофаги, клетки микроглии и дендритные клетки, у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2, описанный в настоящем документе, можно применять для активации передачи сигналов TREM2/DAP12 в миелоидных клетках с модулированием тем самым биологическую активность этих клеток. Такие виды биологической активности предусматривают высвобождение цитокинов, фагоцитоз и микроглиоз.

[00161] Описанные в настоящем документе агонисты TREM2 можно применять для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного препарата для лечения или предупреждения состояний, ассоциированных с дефицитом TREM2 или утратой биологической активности TREM2, как описано в настоящем документе, в том числе, среди прочего, болезни Альцгеймера, болезни Насу-Хакола, лобно-височной деменции, рассеянного склероза, прионной болезни или инсульта. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую описанный в настоящем документе антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00162] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ предупреждения, лечения или облегчения болезни Альцгеймера у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества антигенсвязывающего белка-агониста TREM2, описанного в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления агонист TREM2, вводимый пациенту, представляет собой моноклональное антитело к hTREM2, такое как антитела, последовательности CDR, последовательности переменных областей и последовательности тяжелых и легких цепей которых указаны в **таблицах 2А-2В и 3**.

6.8. Целевые агонисты

[00163] В настоящем изобретении представлены способы лечения, предупреждения

или снижения риска развития состояний, ассоциированных с дефицитом TREM2, у нуждающегося в этом пациента, при этом способ включает введение пациенту эффективного количества молекулы, которая специфически связывается с hTREM2, что повышает активность hTREM2. В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой агонист TREM2. В некоторых вариантах осуществления агонист TREM2 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления агонистом TREM2 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00164] Агонист TREM2 специфически связывается с TREM2 человека (SEQ ID NO:1) или внеклеточным доменом (ECD) TREM2 человека (например, ECD, указанный в SEQ ID NO:2), например, с константой равновесной диссоциации (K_D), составляющей менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ или менее 5 нМ.

6.8.1. Антитела к hTREM2

Антитела

[00165] В одном аспекте настоящее изобретение относится к введению антител к hTREM2 или их антигенсвязывающих фрагментов. Хотя определенные варианты осуществления представлены в контексте интактных антител, предполагается, что молекулы, полученные из антигенсвязывающего фрагмента указанных антител, могут сохранять специфичность связывания и также могут быть применены в настоящем изобретении.

[00166] В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 представляют собой агонисты hTREM2. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 не вступают в перекрестную реакцию с другими белками TREM, такими как TREM1 человека (hTREM1). В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 не связываются с hTREM1, его изоформой или усеченным вариантом. Аминокислотная последовательность изоформы 1 предшественника hTREM1 (эталонная последовательность NCBI: NP_061113.1) представлена ниже как SEQ ID NO:4.

1

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDVKCDYTLEKFASSQKAWQII
RD

61

GEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYNDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPP
K

121

EPHMLFDRIRLVVTKGFGSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKST
181 ADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFNIVILLAGGFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFVP
(SEQ ID NO:4)

[00167] В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 специфически связываются с остатками 19-174 hTREM2 TREM2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 специфически связываются с областью IgV hTREM2, например с остатками 19-140 TREM2 человека.

139-153 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 139-146 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 139-146 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 130-144 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 130-144 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 158-171 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 158-171 из SEQ ID NO:1.

[00169] В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 43-50 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 43-50 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 49-57 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 49-57 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 139-146 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 139-146 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 по настоящему изобретению связываются с одной или более аминокислотами в пределах аминокислотных остатков 140-153 hTREM2 (SEQ ID NO:1) или в пределах аминокислотных остатков белка TREM2, соответствующих аминокислотным остаткам 140-153 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к hTREM2 специфически связываются со стеблевой областью TREM2 человека, например с аминокислотными остатками 145-174 TREM2 человека.

[00170] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически предупреждают деградацию или расщепление hTREM2.

[00171] Используемый в настоящем документе термин «антитело» (Ab) относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с конкретным антигеном, например hTREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 подходит для введения человеку.

[00172] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет

собой поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет собой антитело человека, в частности полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 представляет собой биспецифическое или другое поливалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

[00173] В некоторых вариантах осуществления антитела содержат всю константную область антитела или ее часть. В некоторых вариантах осуществления константная область выбрана из изоформа, выбранного из: IgA (например, IgA₁ или IgA₂), IgD, IgE, IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄) или IgM. В конкретных вариантах осуществления антитела к hTREM2, описанные в настоящем документе, предусматривают IgG₁. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG₁ содержит замену, выбранную из R292C, N297G, V302C, D356E или L358M (в соответствии с нумерацией EU). В других вариантах осуществления антитела к hTREM2 предусматривают IgG₂. В других вариантах осуществления антитела к hTREM2 содержат IgG₄. Используемый в настоящем документе термин «константная область» антитела включает природную константную область или любые ее аллотипы или природные варианты.

[00174] Легкая константная область антитела к hTREM2 может содержать легкую лямбда-область (λ) или легкую каппа-область (κ). Легкая λ -область может принадлежать к любому из известных подтипов, например, λ_1 , λ_2 , λ_3 или λ_4 .

[00175] Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» не ограничен антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело получают из одного клона, в том числе любого эукариотического, прокариотического или фагового клона, любым доступным или известным в уровне техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра способов, известных в уровне техники, включая использование гибридомных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[00176] Термин «химерное» антитело, используемый в настоящем документе, относится к антителу, имеющему переменные последовательности, полученные из иммуноглобулина одного вида, такого как крысиное или мышьеанное антитело, и константную область иммуноглобулина другого вида, такую как матрица иммуноглобулина человека. Другие примеры химерного антитела включают переменную область иммуноглобулина, полученного от человека, с константной областью иммуноглобулина мыши.

[00177] «Гуманизированные» формы отличных от человеческих (например, мышьиных) антител содержат практически все области CDR и переменные области

отличного от человеческого иммуноглобулина и все или по сути все области FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина.

[00178] «Антитела человека» предусматривают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека. Антитела человека могут быть получены от животных, которые являются трансгенными по одному или более иммуноглобулинам человека. Например, у трансгенных животных может отсутствовать эндогенная выработка одного или более иммуноглобулинов, как, например, Xenomouse®, и они могут быть сконструированы для выработки антител с полностью человеческими белковыми последовательностями при иммунизации. Антитела человека также могут быть получены различными способами, известными в уровне техники, в том числе с помощью выделения из библиотек иммуноглобулинов человека или способов фагового дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека.

[00179] Антитела к hTREM2 по настоящему изобретению включают молекулы полноразмерных (интактных) антител или их части. Антитела к hTREM2 могут представлять собой антитела, последовательности которых модифицированы с изменением по меньшей мере одной биологической эффекторной функции, опосредованной константной областью (например, повышенной или сниженной степени связывания с одним или более Fc-рецепторами (FcγR), как, например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA и/или FcγRIIB).

[00180] Антитела к hTREM2 с высокой аффинностью в отношении hTREM2 могут быть необходимы для терапевтических и диагностических путей применения. Соответственно, в настоящем изобретении рассматривают антитела, обладающие высокой аффинностью связывания в отношении hTREM2. В конкретных вариантах осуществления антитела к hTREM2 связываются с hTREM2 с аффинностью, составляющей по меньшей мере приблизительно 100 нМ, но могут проявлять более высокую аффинность, например по меньшей мере приблизительно 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,1 нМ, 0,01 нМ или даже выше. В некоторых вариантах осуществления антитела связывают hTREM2 с аффинностью в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 100 пМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 100 пМ до приблизительно 1 нМ или с аффинностью в диапазоне любых из вышеуказанных значений.

[00181] Аффинность антител к hTREM2 в отношении hTREM2 можно определить с использованием способов, хорошо известных в уровне техники или описанных в настоящем документе, таких как, например, без ограничения ELISA, изотермическая титрационная калориметрия, поверхностный плазмонный резонанс, инферотометрия биослоя, связывание с фильтром или флуоресцентная поляризация.

[00182] Антитела к hTREM2 по настоящему изобретению содержат определяющие

комплементарность области (CDR) как в переменных доменах легкой цепи, так и в переменных доменах тяжелой цепи. Антитела к hTREM2 содержат переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, описанные в настоящем документе.

[00183] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 содержит CDRL1 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL2 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRL3 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH1 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; CDRH2 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены; и CDRH3 или ее вариант, предусматривающий одну, две, три или четыре аминокислотные замены, где аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 представлены в **таблицах 1А** и **1В** ниже, наряду с примерными легкими цепями и переменными областями.

Таблица 1А. Примерные переменные области легкой цепи антитела к hTREM2

Аминокислотная последовательность VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFAVYYCLQDNNFPPTFG QGTVKVDIK SEQ ID NO:5	RASQSVSSN LA SEQ ID NO:6	GASTRAT SEQ ID NO:7	LQDNNFPPT SEQ ID NO:8

Таблица 1В. Примерные переменные области тяжелой цепи антитела к hTREM2

Аминокислотная последовательность VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIYPGDADARYSPSFQGGVVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYFC ARRRQGIFGDALDFWGGTLVTVS S SEQ ID NO:9	SYWIG SEQ ID NO:10	IYPGDADAR YSPSFQG SEQ ID NO:11	RRQGIFGDA LDF SEQ ID NO:12

[00184] Как отмечалось выше, антитела к hTREM2 могут содержать одну или более CDR, представленных в **таблице 1А** (CDR легкой цепи, т. е. CDRL) и **таблице 1В** (CDR тяжелой цепи, т. е. CDRH).

[00185] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит легкую цепь, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:6, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность в

соответствии с SEQ ID NO:7, CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:8 или любую аминокислотную последовательность CDRL1, CDRL2 или CDRL3, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в любую из SEQ ID NO:6-8. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная активность связывания антитела к hTREM2. В этих и других вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:10, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:11, CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:12 или любую аминокислотную последовательность CDRH1, CDRH2 или CDRH3, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в любую из SEQ ID NO:10-12. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная активность связывания антитела к hTREM2.

[00186] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:6; CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:7; и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:10; CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:11; и CDRH3 с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO:12.

[00187] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:5 или любую аминокислотную последовательность, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в SEQ ID NO:5. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная активность связывания антитела к hTREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:9 или любую аминокислотную последовательность, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в SEQ ID NO:9. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная

активность связывания антитела к hTREM2.

[00188] В конкретных вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:5, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:9.

[00189] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из перечисленных в таблице 2.

Таблица 2. Примерные тяжелая и легкая цепи антитела к hTREM2

Цепь	Описание	Аминокислотная последовательность
Легкая цепь	hT2AB	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVY YCLQDNNFPPTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:13)
	hT2AB без лидерной последовательности	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPAR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCLQDNNFPPTFGQGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:14)
	mT2Ab (mIgG1)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVY YCLQDNNFPPTFGQGTKVDIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNPFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NEC (SEQ ID NO:15)
Тяжелая цепь	hT2AB	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIYPGDADARYSPSFQQQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYFCARRRQGIQFDALDFWGGQTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

Цепь	Описание	Аминокислотная последовательность
	hT2AB без лидерной последовательности	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDADAR YSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYFCARRRQ GIFGDALDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)
	mT2AB (mIgG1)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGIIYPGDADARYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYFCARRRQGGIFGDALDFWGQGTTLTVSSAKT TPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSPSRPSETVTCNVAHP ASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITIT LTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQ FNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVE WQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNPKSNWEA GNTFTCSVLHEGLHNHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:18)

[00190] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO:13-15 или любую аминокислотную последовательность, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в любой из SEQ ID NO:13-15. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная активность связывания антитела к hTREM2. В этих и других вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO:16-18 или любую аминокислотную последовательность, которая предусматривает одну или более, например одну, две, три, четыре или более, аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен), делеций или вставок не более пяти, четырех, трех, двух или одной аминокислоты в любой из SEQ ID NO:16-18. При таких заменах, делециях и вставках будет сохраняться значительная активность связывания антитела к hTREM2.

[00191] В некоторых вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:13, и/или вариabельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:16. В других вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную

последовательность в соответствии с SEQ ID NO:14, и/или переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:17. В других вариантах осуществления антитело к hTREM2 содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:15, и/или переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18.

[00192] В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой hT2AB, представляющее собой агонист hTREM2, содержащий легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:13, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой hT2AB, имеющее N-концевые лидерные последовательности, содержащее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:14, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:17. В некоторых вариантах осуществления антитело к TREM2 представляет собой mT2AB, представляющее собой химеру переменных областей hT2AB с мышечными каппа-областями и константными областями IgG1, содержащими легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:14, или ее неэффективный вариант и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:17, или ее неэффективный вариант.

Полинуклеотиды

[00193] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие области, описанные в настоящем документе. В частности, полинуклеотиды представляют собой выделенные полинуклеотиды. Полинуклеотиды могут быть функционально связаны с одной или более гетерологичными контрольными последовательностями, которые контролируют экспрессию гена, с созданием рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать представляющий интерес полипептид. Конструкции экспрессии, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий соответствующий полипептид или белок, могут быть введены в соответствующие клетки-хозяева с экспрессией соответствующего полипептида.

[00194] Как будет понятно специалистам в данной области, из-за вырожденности генетического кода, когда одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, может быть получено чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует CDR, переменные области и тяжелые и легкие цепи или другие компоненты описанных в настоящем документе антигенсвязывающих белков. Таким образом, идентифицировав конкретную аминокислотную последовательность, специалист в данной области может получить любое количество различных нуклеиновых кислот с помощью простой модификации

последовательности одного или более кодонов таким путем, который не приводит к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка. В связи с этим настоящее изобретение включает все возможные варианты полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды, описанные в настоящем документе.

[00195] Термин «выделенная нуклеиновая кислота», который используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «выделенный полинуклеотид», представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого нуклеиновая кислота была выделена, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативно из матрицы или химически, таких как продукты ПЦР, молекулы кДНК или, например, олигонуклеотиды, понятно, что нуклеиновые кислоты, образующиеся в результате таких процессов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции на основе нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления нуклеиновые кислоты практически свободны от загрязняющего эндогенного материала.

[00196] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует CDR L1, CDR L2 и CDR L3 вариательной области легкой цепи, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует CDR H1, CDR H2 и CDR H3 вариательной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе.

[00197] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует CDR L1, CDR L2 и CDR L3 вариательной области легкой цепи и CDR H1, CDR H2 и CDR H3 вариательной области тяжелой цепи, описанные в настоящем документе.

[00198] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VL вариательной области легкой цепи, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности аминокислотной последовательности вариательной области легкой цепи, описанной в настоящем документе.

[00199] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH вариательной области тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательности аминокислотной последовательности вариательной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе.

[00200] В некоторых вариантах осуществления на полинуклеотиды в настоящем документе можно влиять различными способами с обеспечением экспрессии кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с контрольными последовательностями, в том числе, среди прочего, промоторами транскрипции, лидерными последовательностями, энхансерами транскрипции, сайты связывания или входа рибосомы, последовательностями терминации

и последовательностями полиаденилирования для экспрессии полинуклеотида и/или соответствующего полипептида. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы в зависимости от вектора экспрессии. Методики модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с использованием способов рекомбинантной ДНК хорошо известны в уровне техники. Руководство представлено в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); and *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel. F. ed., Greene Pub. Associates (1998), обновления до 2013 года.

[00201] В некоторых вариантах осуществления варианты антигенсвязывающих белков, в том числе варианты, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей полипептид, с применением касетного или ПЦР-мутагенеза или других методик, хорошо известных из уровня техники, для получения ДНК, кодирующей вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в клеточной культуре, как описано в настоящем документе. Однако антигенсвязывающие белки, содержащие варианты CDR, имеющие не более приблизительно 100-150 остатков, можно получать путем синтеза *in vitro* с применением известных методик. Варианты обычно проявляют ту же качественную биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, например связывание с антигеном. Такие варианты включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антигенсвязывающих белков. Для достижения конечной конструкции выполняют любую комбинацию делеции, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут менять посттрансляционные процессы антигенсвязывающего белка, в том числе изменение количества или положения сайтов гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления варианты антигенсвязывающего белка получают с целью модификации тех аминокислотных остатков, которые непосредственно участвуют в связывании эпитопа. В других вариантах осуществления модификация остатков, которые непосредственно не участвуют в связывании эпитопа, или остатков, не вовлеченных каким-либо образом в связывание эпитопа, является необходимой для целей, обсуждаемых в настоящем документе. Предполагается мутагенез в любой из областей CDR, каркасных областей и/или константных областей. Специалист в данной области может применять методики ковариационного анализа для конструирования полезных модификаций в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка. См., например, Choulier, et al., *Proteins* 41:475-484, 2000; Demarest et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, 335:41-48; Hugo et al., *Protein Engineering*, 2003, 16(5):381-86; Aurora et al., публикацию патента США № 2008/0318207 A1; Glaser et al., публикацию патента США № 2009/0048122 A1; Urech et al., WO 2008/110348 A1; Borrás et al., WO 2009/000099 A2. Такие модификации, определенные с помощью ковариационного анализа, могут улучшить характеристики эффективности,

фармакокинетики, фармакодинамики и/или технологичности антигенсвязывающего белка.

[00202] В другом аспекте настоящее изобретение также предусматривает векторы, содержащие одно или более из нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе (например, варьируемые области, легкие цепи и тяжелые цепи). Используемый в настоящем документе термин «вектор» означает любую молекулу или единицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), применяемую для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина. Примеры векторов включают без ограничения плазмиды, вирусные векторы, неэписомные векторы млекопитающих и экспрессионные векторы, например рекомбинантные экспрессионные векторы. Используемый в настоящем документе термин «вектор экспрессии» или «конструкция экспрессии» относится к рекомбинантной молекуле ДНК, содержащей требуемую кодирующую последовательность и соответствующие контрольные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Вектор экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые влияют на транскрипцию, трансляцию или контролируют их и при наличии интронов влияют на РНК-сплайсинг кодирующей области, функционально связанной с ними. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования. Кроме того, если требуется, последовательность секреторного сигнального пептида может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки.

[00203] Рекомбинантный вектор экспрессии может быть любым вектором (например, плазмидой или вирусом), который можно легко подвергнуть процедурам рекомбинантной ДНК и который может вызвать экспрессию полинуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами. Примеры векторов экспрессии включают, среди прочего, векторы на основе промоторов T7 или T7lac (pACYC: Novagen; pET); векторы на основе бакуловирусных промоторов (например, pBAC); векторы на основе промоторов Ef1- α и HTLV (например, pFUSE2; Invitrogen, штат Калифорния, США); векторы на основе энхансера CMV и промоторов генов легкой цепи ферритина человека (например, pFUSE: Invitrogen, штат калифорния, USA); векторы на основе промоторов CMV (например, pFLAG: Sigma, США) и векторы на основе промоторов дигидрофолатредуктазы (например, pEASE: Amgen, США). Для кратковременной или

стабильной экспрессии представляющих интерес полипептидов можно применять различные векторы.

Клетки-хозяева

[00204] В другом аспекте полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем документе (например, вариабельные области, легкие цепи и тяжелые цепи), функционально связан с одной или более контрольными последовательностями для экспрессии полипептида в клетке-хозяине. Соответственно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку-хозяина, содержащую один или более векторов экспрессии, кодирующих компоненты антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2, описанных в настоящем документе.

[00205] Примерные клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот. Прокариотические клетки-хозяева включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacillus, например B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas и Streptomyces. Эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии рекомбинантных полипептидов. Saccharomyces cerevisiae или обычные пекарские дрожжи наиболее часто применимы среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в настоящем документе, такие как Pichia, например P. pastoris, Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces, Yarrowia; Candida; Trichoderma reesia; Neurospora crassa; Schwanniomyces, например Schwanniomyces occidentalis; и мицелиальные грибы, такие как, например, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и хозяева Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

[00206] Клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антигенсвязывающих белков могут быть получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты, а также соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых из таких хозяев, как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (плодовая мушка) и Bombyx mori. Общедоступно множество вирусных штаммов для трансфекции таких клеток, например вариант L-1 NPV Autographa californica и штамм Bm-5 NPV Bombyx mori.

[00207] Клетки-хозяева позвоночных также являются подходящими хозяевами, и рекомбинантное получение антигенсвязывающих белков из таких клеток стало обычной процедурой. Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в уровне техники и включают без ограничения иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых

культур (ATCC), в том числе без ограничения клетки яичника китайского хомячка (CHO), в том числе клетки CHOК1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77: 4216); линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию почки эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977); клетки почек детенышей хомячков (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 1980, 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 1982, 383:44-68); клетки MRC 5 или клетки FS4; клетки миеломы млекопитающих и количество других клеточных линий. В определенных вариантах осуществления клеточные линии можно выбирать посредством определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии и конститутивно продуцируют антигенсвязывающие белки со свойствами, заключающимися в связывании TREM2 человека. В другом варианте осуществления можно выбирать клеточную линию из В-лимфоцитарной линии дифференцировки, которая не продуцирует свое собственное антитело, но обладает способностью продуцировать и секретировать гетерологичное антитело. Клетки CHO являются предпочтительными клетками-хозяевами в некоторых вариантах осуществления для экспрессии антигенсвязывающих белков-агонистов TREM2 по настоящему изобретению.

[00208] В различных вариантах осуществления введение и трансформацию клетки-хозяина полинуклеотидом по настоящему изобретению, таким как вектор экспрессии для экспрессии антигенсвязывающего белка, осуществляют способами, включающими трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном или другие известные способы. В некоторых вариантах осуществления выбор способа может зависеть от типа используемой клетки-хозяина. Подходящие способы описаны, например, в Sambrook et al., 2001.

Экспрессия и выделение

[00209] В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина, содержащая полинуклеотид, кодирующий один или более компонентов антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе (например, переменные области, легкие цепи и тяжелые цепи), применяют для экспрессии представляющего интерес антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах осуществления способ экспрессии антигенсвязывающего белка включает культивирование клетки-хозяина в подходящей среде и условиях, подходящих для экспрессии представляющего интерес белка.

[00210] Выбор типа среды и условий культивирования зависит от типа клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления примерные среды для клеток-хозяев млекопитающих включают, в качестве примера и без ограничения, среду Хэма F10 (Sigma), минимальную основную среду (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM, Sigma). В некоторых вариантах осуществления среда может быть дополнена при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство, представляющее собой Gentamycin™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. В некоторых вариантах осуществления при условиях культивирования, такие как температура, pH, % CO₂ и т. п., можно применять условия, доступные и известные специалисту в данной области.

[00211] В некоторых вариантах осуществления экспрессированный антигенсвязывающий белок выделяют и/или очищают из клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, в которых экспрессированный белок присутствует в среде, среду, содержащую экспрессированный белок, подвергают процедурам выделения. В некоторых вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок продуцируется внутриклеточно, клетки подвергают разрушению, и на первой стадии частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты удаляют, например центрифугированием или ультрафильтрацией. Впоследствии антигенсвязывающий белок может быть выделен и дополнительно очищен различными известными способами. Такие методики выделения включают аффинную хроматографию с белком-А-сефарозой, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, определение дифференциальной растворимости и т. п. (см., например, Fisher, Laboratory Techniques, In Biochemistry And Molecular Biology, Work and Burdon, eds., Elsevier (1980); Antibodies: A Laboratory Manual, Greenfield, E.A., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2012); Coligan, et al., выше, разделы 2.7.1-2.7.12 и разделы 2.9.1-2.9.3; Barnes, et al., Purification of Immunoglobulin G (IgG), in Methods Mol. Biol., Vol. 10, pages 79-104, Humana Press (1992)).

[00212] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело может быть дополнительно очищено по следующим параметрам: (1) вес белка, определенный с применением способа Лоури; (2) степень, достаточная для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающейся чашкой; или (3) гомогенность с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Очищенное антитело может составлять 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше или по меньшей

мере 99% по весу, как определено вышеуказанными способами.

Составы на основе антител

[00213] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую одно или более антител, активирующих TREM2, антител-агонистов TREM2 и антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе, вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами, солюбилизаторами, эмульгаторами, консервантами и/или вспомогательными средствами. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции. «Фармацевтически приемлемый» относится к молекулам, соединениям и композициям, которые нетоксичны для реципиентов-людей в применяемых дозах и концентрациях и/или не вызывают аллергических или нежелательных реакций при введении людям. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидрогенсульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгирующие вещества, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или увлажняющие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки;

разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические вспомогательные средства. Способы и подходящие материалы для составления молекул для терапевтического применения известны в фармацевтических дисциплинах и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[00214] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит стандартный фармацевтический носитель, такой как стерильный забуференный фосфатом физиологический раствор, бактериостатическая вода и т. п. Можно применять различные водные носители, например воду, забуференную воду, 0,4% физиологический раствор, 0,3% глицин и т. п., и они могут включать другие белки для повышенной стабильности, такие как альбумин, липопроtein, глобулин и т. д., подвергнутые небольшим химическим модификациям или т. п.

[00215] Примерные концентрации антигенсвязывающих белков в композиции могут составлять от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл, или в качестве альтернативы от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. Водный состав антигенсвязывающего белка может быть получен в рН-буферном растворе, например, при рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5, или от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,5, или в качестве альтернативы приблизительно 5,0. Примеры буферов, подходящих для рН в этом диапазоне, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот. Концентрация буфера может составлять от приблизительно 1 мМ до приблизительно 200 мМ или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 60 мМ, в зависимости, например, от буфера и требуемой изотоничности состава.

[00216] В состав может быть включен регулятор тоничности, который также может участвовать в стабилизации антигенсвязывающего белка. Примеры регуляторов тоничности включают полиолы, такие как маннит, сахароза или трегалоза. Предпочтительно, водная композиция является изотонической, хотя подходящими могут быть гипертонические или гипотонические растворы. Примерные концентрации полиола в композиции могут составлять от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/об.

[00217] Поверхностно-активное вещество также может быть добавлено к составу антигенсвязывающего белка для уменьшения агрегации составленного антигенсвязывающего белка, и/или минимизации образования частиц в составе, и/или снижения адсорбции. Примерные поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 20 или полисорбат 80) или полуксамеры (например, полуксамер 188). Примерные концентрации поверхностно-активного вещества могут составлять от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5%, или от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,2%, или в качестве альтернативы от приблизительно 0,004% до приблизительно 0,01% вес/об.

[00218] В одном варианте осуществления композиция содержит идентифицированные выше средства (т. е. антигенсвязывающий белок, буфер, полиол и поверхностно-активное вещество) и фактически не содержит одного или более консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол и хлорид бензетония. В другом варианте осуществления в композицию может быть включен консервант, например, в концентрациях, составляющих от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% или в качестве альтернативы от приблизительно 0,5% до приблизительно 1%. Один или более других фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов, таких как те, которые описаны в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company, могут быть включены в состав при условии, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на требуемые характеристики состава.

[00219] Терапевтические составы антигенсвязывающего белка готовят для хранения путем смешивания антигенсвязывающего белка, характеризующегося требуемой степенью чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозах и концентрациях и включают буферы (например, фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот); антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и метионин); консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (например, меньше чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); гидрофильные полимеры (например, поливинилпирролидон); аминокислоты (например, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин); моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбат 20 или полисорбат 80) или полуксамеры (например, полуксамер 188) или полиэтиленгликоль (PEG).

[00220] В одном варианте осуществления подходящая композиция согласно заявленному изобретению содержит изотонический буфер, такой как фосфатный, ацетатный или трис-буфер, в комбинации с регулятором тоничности, таким как полиол, сорбит, сахароза или хлорид натрия, который тонизирует и стабилизирует. Одним примером такого регулятора тоничности является 5% сорбит или сахароза. Кроме того,

состав может необязательно включать поверхностно-активное вещество в количестве от 0,01% до 0,02% вес/об, например для предупреждения агрегации или улучшения стабильности. Значение рН композиции может составлять от 4,5 до 6,5 или от 4,5 до 5,5. Другие иллюстративные описания фармацевтических составов для антигенсвязывающих белков можно найти в публикации патента США № 2003/0113316 и патенте США № 6171586, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00221] Также рассмотрены суспензии и кристаллические формы антигенсвязывающих белков. Способы получения суспензий и кристаллических форм известны специалисту в данной области.

[00222] Составы, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Композиции по настоящему изобретению могут быть стерилизованы с помощью стандартных, хорошо известных методик стерилизации. Например, стерилизация легко осуществляется путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Полученные растворы могут быть упакованы для применения или отфильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным раствором перед введением.

[00223] Способ сублимационного высушивания часто применяют для стабилизации полипептидов для длительного хранения, особенно если полипептид относительно нестабилен в жидких композициях. Цикл лиофилизации обычно состоит из трех стадий: замораживание, первичное высушивание и вторичное высушивание (см. Williams and Polli, *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1984, 38(2):48-59). На стадии замораживания раствор охлаждают до тех пор, пока он не будет надлежащим образом заморожен. Объемная вода в растворе на этой стадии образует лед. Лед сублимирует на стадии первичного высушивания, которую осуществляют путем понижения давления в камере ниже давления паров льда с применением вакуума. Наконец, сорбированную или связанную воду удаляют на стадии вторичного высушивания при пониженном давлении в камере и повышенной температуре полки. Посредством такого способа получают материал, известный как лиофилизированная масса. После этого масса может быть восстановлена перед применением.

[00224] Стандартная практика восстановления лиофилизированного материала заключается в добавлении объема чистой воды (обычно эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации), хотя для получения фармацевтических препаратов для парентерального введения иногда применяют разбавленные растворы антибактериальных средств (см. Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Volume 18: 1311-1354, 1992).

[00225] Было отмечено, что в некоторых случаях вспомогательные вещества действуют как стабилизаторы для продуктов, подвергнутых сублимационному высушиванию (см. Carpenter et al., Volume 74: 225-239, 1991). Например, известные вспомогательные вещества включают полиолы (в том числе маннит, сорбит и глицерин);

сахара (в том числе глюкозу и сахарозу) и аминокислоты (в том числе аланин, глицин и глутаминовую кислоту).

[00226] Кроме того, полиолы и сахара также часто применяют для защиты полипептидов от замерзания и повреждения, вызванного высыханием, и для повышения стабильности при хранении в высушенном состоянии. В целом, сахара, в частности дисахариды, эффективны как в способе сублимационного высушивания, так и при хранении. Другие классы молекул, включая моно- и дисахариды и полимеры, такие как PVP, также были описаны как стабилизаторы лиофилизированных продуктов.

[00227] Для инъекции фармацевтическая композиция и/или лекарственный препарат могут быть представлены в виде порошка, подходящего для разбавления подходящим раствором, как описано выше. Их примеры включают без ограничения лиофилизированные, ротационно-высушенные или высушенные с помощью распылительного высушивания порошки, аморфные порошки, гранулы, осадки или частицы. Для инъекции составы могут необязательно содержать стабилизаторы, модификаторы pH, поверхностно-активные вещества, модификаторы биодоступности и комбинации указанных.

[00228] Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антигенсвязывающий белок, причем эти матрицы имеют форму формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как Lupron Depot™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидрокси-масляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, дают возможность высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. В случае если инкапсулированные полипептиды остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. Для стабилизации могут быть разработаны рациональные стратегии в зависимости от используемого механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации заключается в образовании межмолекулярных S-S-связей посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги, применения соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

[00229] Составы по настоящему изобретению могут быть разработаны для

кратковременного, быстрого высвобождения, длительного действия или замедленного высвобождения. Таким образом, фармацевтические составы также могут быть составлены для контролируемого высвобождения или для медленного высвобождения.

[00230] Конкретные дозы могут быть скорректированы в зависимости от заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона субъекта, интервалов доз, путей введения, скорости экскреции и комбинаций лекарственных средств.

[00231] Антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 по настоящему изобретению можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное, интратекальное, интрацеребральное, интрацеребровентрикулярное и интраназальное и, если требуется, для местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральное введение включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутрикожное или подкожное введение. Кроме того, антигенсвязывающий белок подходящим образом вводят путем импульсной инфузии, в частности при снижающихся дозах антигенсвязывающего белка. Предпочтительно дозу вводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или длительным. Предусмотрены другие способы введения, в том числе местное, в частности, трансдермальное, трансмукозальное, ректальное, пероральное или местное введение, например, через катетер, расположенный рядом с нужным участком. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок-агонист TREM2 по настоящему изобретению вводят внутривенно или подкожно в физиологическом растворе в дозе от 0,01 мг/кг до 100 мг/кг, с частотой от ежедневной до еженедельной или ежемесячной (например, каждый день, через день, каждый третий день или 2, 3, 4, 5 или 6 раз в неделю), предпочтительно, доза составляет в диапазоне от 0,1 до 45 мг/кг, от 0,1 до 15 мг/кг или от 0,1 до 10 мг/кг с частотой один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз в месяц.

[00232] Описанные в настоящем документе антигенсвязывающие белки-агонисты TREM2 (например, моноклональные антитела-агонисты TREM2 и их связывающие фрагменты) полезны для предупреждения, лечения или облегчения состояния, связанного с дефицитом TREM2 или утратой биологической функции TREM2 у нуждающегося в этом пациента. Применяемый в настоящем документе термин «осуществление лечения» или «лечение» представляет собой вмешательство, выполненное с целью предупреждения развития или изменения патологии нарушения. Соответственно «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. К пациентам, нуждающимся в лечении, относятся пациенты, у которых уже диагностировано нарушение или состояние или которые страдают от них, а также пациенты, у которых надлежит предупредить расстройство или состояние, такие как пациенты, которые имеют риск развития нарушения или состояния, например, на основании генетических маркеров. Термин «лечение» включает любой признак успеха в

облегчение повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как смягчение боли, ремиссия, ослабление симптомов или способствование лучшей переносимости повреждения, патологии или состояния пациента, замедление темпа дегенерации или ухудшения, способствование менее изнурительному протеканию конечной стадии дегенерации или улучшение физического или психического здоровья пациента. Лечение или облегчение симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах, в том числе по результатам физического осмотра, самоотчетов пациента, когнитивных тестов, моторных функциональных тестов, психоневрологических обследований и/или психиатрической оценки.

7. ПРИМЕРЫ

[00233] Следующие примеры, которые отмечают определенные особенности и свойства примерных вариантов осуществления антител и связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, представлены в целях иллюстрации, а не ограничения.

7.1. Пример 1. Состояние предшествующей активации формирует ответ микроглии на антитело к TREM2 человека в мышинной модели болезни Альцгеймера

7.1.1. РЕФЕРАТ

[00234] Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (TREM2), поддерживает ответ микроглии на стимулы повреждения головного мозга, в том числе апоптотических клеток, повреждения миелина и бета-амилоида (A β). Риск болезни Альцгеймера (AD) ассоциирован с вариантом TREM2^{R47H}, который нарушает связывание лиганда и, следовательно, ответ микроглии на патологию A β . В настоящем документе показано, что взаимодействие TREM2 с mAb hT2AB в качестве суррогатного лиганда активирует микроглию у трансгенных мышей 5XFAD, у которых накапливается A β и экспрессируется либо общий вариант TREM2, (TREM2^{CV}), либо TREM2^{R47H}. С помощью scRNA-seq микроглии мышей TREM2^{CV}-5XFAD, однократно обработанных контрольным hIgG1, выявляли четыре различные траектории активации микроглии, приводящие к типам ассоциированной с заболеванием (DAM), интерферон-реактивной (IFN-R), циклирующей (Cys-M) и экспрессирующей MHC-II (MHC-II) микроглии. Все они были недостаточно представлены у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD, что позволяет предположить, что участие лиганда TREM2 необходимо для траекторий активации микроглии. Более того, типы Cys-M и IFN-R микроглии были более распространены у самок, чем у самцов мышей TREM2^{CV}-5XFAD, вероятно, из-за большей нагрузки A β у самок мышей 5XFAD. Однократная системная инъекция hT2AB пополняла пулы Cys-M, IFN-R и MHC-II у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD. Однако у мышей TREM2^{CV}-5XFAD hT2AB приблизил представление типов Cys-M и IFN-R микроглии у самцов к таковой у самок, у которых эти траектории уже достигли максимальной мощности. Более того, hT2AB индуцирует сдвиги в паттернах экспрессии генов во всех пулах микроглии, не влияя на репрезентативность. Повторное лечение мураинизированной версией hT2AB в течение 10 дней увеличивало содержание хемокинов в головном мозге мышей TREM2^{R47H}-5XFAD, что согласуется с

увеличением количества микроглии. Таким образом, влияние hT2AB на микроглию определяют по степени вовлечения эндогенного лиганда TREM2 и базальной активации микроглии.

7.1.2. Значимость

[00235] Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой наиболее распространенную деменцию; никакая терапия не останавливает ее прогрессирование. Ответы микроглии, которые модулируют течение заболевания, запускаются патологией AD, в том числе бляшками амилоида- β ($A\beta$), нейрофибриллярными клубками и потерей синапсов. Рецептор TREM2 способствует ответу микроглии на патологию и вариант, TREM2^{R47H}, ухудшает связывание лигандов и коррелирует с повышенным риском AD. Применяя scRNA-seq, авторы настоящего изобретения задались вопросом: может ли антитело против TREM2, действующее как суррогатный лиганд, стимулировать микроглию у мышей, у которых накапливается $A\beta$ и экспрессируется либо обычный вариант TREM2 (TREM2^{CV}), либо TREM2^{R47H}? Одна системная инъекция антитела к TREM2 восстанавливает активацию микроглии у мышей TREM2^{R47H}, но происходит ограниченная активация у мышей, несущих TREM2^{CV}, которая связывает эндогенные лиганды. Таким образом, антитело к TREM2 может усиливать реакции микроглии во время AD, в зависимости от ранее существовавшего вовлечения TREM2 и исходного уровня активации..

7.1.3. Введение

[00236] Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенной причиной прогрессирующей деменции у пожилых людей; она поражает более 5,5 миллионов американцев, большинство из которых в возрасте 65 лет и старше, и которая занимает 6^{-е} место среди основных причин смерти в Соединенных Штатах Америки (<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>). Патологические особенности AD предусматривают внеклеточные амилоидные бляшки, состоящие из пептида амилоида β ($A\beta$), внутринейрональные нейрофибриллярные клубки, состоящие из агрегированного гиперфосфорилированного тау-белка, нейроиммунную активацию и снижение плотности синапсов (1). Продольные исследования естественного течения, такие как Инициатива нейровизуализации болезни Альцгеймера, продемонстрировали, что отложение $A\beta$ в центральной нервной системе (ЦНС) происходит на ранних стадиях заболевания и сопровождается последующей патологией тау с последующей гибелью нейронов и когнитивными нарушениями (2). Накопление $A\beta$ также вызывает ответ микроглии, резидентных макрофагов головного мозга, которые поддерживают развитие, функцию и иммунную защиту ЦНС (3).

[00237] В то время как все доминантные мутации, вызывающие семейную AD с ранним началом, происходят либо в субстрате (белке-предшественнике амилоида, APP), либо в протеазах (пресенилинах) протеолитического пути, который генерирует $A\beta$ (4), полногеномные ассоциативные исследования обнаружили множество генетических полиморфизмов, связанных с AD с поздним началом в генах, экспрессируемых

микроглией, таких как TREM2, CD33, SPI1, SHIP1 и PLC γ 2 (5, 6), что дает убедительные доказательства того, что микроглия активно контролирует начало и/или прогрессирование патологии AD (7). Микроглия накапливается вокруг бляшек A β , удерживая и уплотняя их, тем самым уменьшая маркеры аксональной дистрофии в окружающих нейронах (8). Во время этого процесса микроглия изменяет свои фенотипические и транскрипционные свойства, переходя от «гомеостатического» к активированному профилю, часто определяемому как микроглия, ассоциированная с заболеванием (DAM) (6). Этот переход к фенотипу DAM сильно активируется в амилоидных моделях AD у трансгенных мышей (9, 10), но в меньшей степени наблюдается в посмертном головном мозге человека при AD (11, 12), что потенциально отражает недостаточный ответ микроглии на повреждение ЦНС. у лиц, у которых развивается патология AD.

[00238] Было показано, что переход микроглии в DAM зависит от триггерного рецептора, экспрессируемого в миелоидных клетках 2 (TREM2), рецептора поверхности клеток макрофагов, обильно экспрессируемого в микроглии (13). TREM2 является представителем суперсемейства иммуноглобулинов, который связывает фосфолипиды, апоптотические клетки, липопротеины, такие как HDL, LDL и ApoE, а также A β . TREM2 передает внутриклеточные сигналы через ассоциированный адаптер DAP12, который рекрутирует протеинтирозинкиназу Syk, что приводит к каскаду событий фосфорилирования тирозина белка, которые способствуют пролиферации, выживанию, продуцированию АТФ и биосинтезу белка. Эктодомен TREM2 отщепляется от клеточной поверхности протеазами, тем самым ограничивая передачу сигналов TREM2 и высвобождая растворимый TREM2 (sTREM2). (14, 15). Генетические варианты в TREM2 связаны с множественными нейродегенеративными заболеваниями, в том числе болезнью Насу-Хакола, лобно-височной деменцией и AD. Из-за своей роли в метаболической активации TREM2 может функционировать как костимулирующая молекула, которая поддерживает активацию микроглии во время перехода к DAM, который инициируется различными рецепторами, задействованными стимулами повреждения ЦНС, такими как A β , апоптотический клеточный дебрис и повреждение миелина (13).

[00239] Несколько наблюдений показали, что активация микроглии через TREM2 может обеспечить многообещающий терапевтический подход к AD. Во-первых, миссенс-замена аргинина на гистидин в аминокислоте 47 (TREM2^{R47H}), которая увеличивает риск AD в 2-5 раз (16, 17), ухудшает связывание лиганда (18) и ограничивает активацию микроглии у людей (11) и мышинных моделях болезни Альцгеймера (8, 19). Во-вторых, полное удаление экспрессии Trem2 у мышей, у которых накапливаются бляшки A β , ослабляет инкапсуляцию микроглией бляшек A β , что усиливает их нейротоксичность (20, 21) и блокирует превращение микроглии из гомеостатической в DAM (9). И наоборот, у мышей со сверхэкспрессией TREM2 наблюдается меньшую степень A β -индуцированной патологии (22). Наконец, недавно было показано, что активирующие антитела к TREM2 усиливают ответ микроглии на A β *in vitro* (23) уменьшают нагрузку на бляшки A β после кратковременного лечения (24) и способствуют пролиферации микроглии, а также

ослабляют нейротоксические эффекты бляшек Аβ после долгосрочное введение(25).

[00240] В данном исследовании авторы настоящего изобретения охарактеризовали биологические эффекты в модели 5XFAD нового mAb-агониста к TREM2 человека, обозначенному hT2AB, и мураинизированной версии этого mAb-агониста TREM2, обозначенного mT2AB. Это антитело связывает распространенный вариант TREM2 (TREM2^{CV}) и вариант TREM2^{R47H}, связанный с AD. hT2AB тестировали на трансгенных мышях, экспрессирующих либо TREM2^{CV}, либо TREM2^{R47H} человека вместо эндогенного TREM2 (19). Этим мышам скрещивали с трансгенными мышами 5XFAD, которые экспрессируют трансгены APP и PSEN1 человека с пятью мутациями, связанными с AD, которые способствуют накоплению бляшек Аβ (26). Одной из особенностей этой модели является смещение по признаку пола в патологии амилоида: самки мышам 5XFAD имеют более выраженную амилоидную патологию, чем самцы.(27, 28).

[00241] Авторы настоящего изобретения впервые показали, что hT2AB является агонистом TREM2, который может преодолевать гематоэнцефалический барьер (BBB) после системного введения. Затем авторы настоящего изобретения исследовали влияние однократной внутрибрюшинной инъекции hT2AB или контрольного hIgG1 на микроглию с помощью одноклеточной РНК-секв. (scRNA-seq). У контрольных мышам, получавших hIgG1, микроглия приобрела континуум переходов клеточного состояния от гомеостатического к четырем различным типам, включая DAM, реагирующую на интерферон (IFN-R), циклирующую (Cys-M) и экспрессирующую MHC-II (MHC-II), что, вероятно, отражает участие различных сигнальных путей. Все траектории требовали TREM2, о чем свидетельствует значительное обогащение терминальными типами микроглии у мышам TREM2^{CV}-5XFAD по сравнению с мышами TREM2^{R47H}-5XFAD и Trem2^{-/-}-5XFAD. Кроме того, типы Cys-M и IFN-R микроглии были более распространены у самок, чем у самцов, что коррелировало с более высокой степенью накопления Аβ у самок. hT2AB способствует повторному входу в клеточный цикл у мышам TREM2^{R47H}-5XFAD и способствует экспансии Cys-M более эффективно у самцов, чем у самок в когорте TREM2^{CV}-5XFAD. Аналогичным образом, hT2AB индуцировал терминальную популяцию IFN-R у TREM2^{R47H}-5XFAD обоих полов, а также у самцов TREM2^{CV}-5XFAD, но не способствовал этой клеточной судьбе у самок TREM2^{CV}-5XFAD, у которых эта популяция уже была сильно индуцирована. Таким образом, опосредованное mAb вовлечение TREM2 в основном увеличивало циклирование и исход IFN-R при дефиците или субоптимальном уровне. Анализ динамики экспрессии отдельных генов показал, что ко-стимулированная экспрессия hT2AB изменяется, как только определяются исходы клеток, но не изменяет транскрипционную идентичность терминальных типов клеток.

[00242] Наконец, авторы настоящего изобретения проверили влияние mT2AB на биохимические анализы головного мозга и гистологические изображения у мышам 5XFAD после повторных инъекций каждые 3 дня в течение короткого периода времени. Лечение с помощью mT2AB привело к наибольшему увеличению уровней CCL4, CXCL10 и IL-1β, которые продуцируются микроглией, у мышам TREM2^{R47H}-5XFAD. Это

согласуется с данными scRNA-seq, предполагающими, что mT2AB вызывает большую активацию микроглии у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD, чем у мышей TREM2^{CV}-5XFAD. Самки мышей 5XFAD, несущие TREM2^{R47H} и TREM2^{CV}, демонстрировали более высокие уровни отложения амилоида по сравнению с их коллегами-самцами, что согласуется с наблюдениями более значительных сдвигов, вызванных hT2AB, у самцов по сравнению с самками. Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что амплитуда hT2AB-опосредованных эффектов на микроглию определяется их исходным циклированием и статусом дифференцировки, ранее существовавшим вовлечением TREM2 и исходной активацией микроглии до опосредованной mAb стимуляции.

7.1.4. Результаты

hT2AB представляет собой mAb-агонист, специфичное в отношении TREM2 человека

[00243] hT2AB был получен путем иммунизации животных Xenomouse® (29) с помощью геномной пушки кДНК, кодирующей TREM2 и DAP12 человека. Моноклональное антитело hT2AB было выбрано из панели агонистических антител к TREM2. hT2AB селективно связывался с очищенным TREM2 человека (аффинность (K_D)=50 нМ) (фиг. 1A). Функциональную эффективность определяли по индукции pSyk в клетках HEK293, экспрессирующих TREM2 и DAP12 человека (клон G13), и в макрофагах, происходящих из моноцитов человека (hMac), показывая EC50, составляющую 222 пМ и 166 пМ, соответственно (фиг. 1-1C). Индукция hT2AB внутриклеточной передачи сигналов зависела от двухвалентного связывания и перекрестного связывания TREM2, о чем свидетельствует отсутствие активности его мономерного антигенсвязывающего фрагмента (Fab) (фиг. 1D). Кроме того, высвобождение sTREM2 после стимуляции hMac снижалось с помощью hT2AB (фиг. 1E).

[00244] Чтобы изучить влияние hT2AB-опосредованной активации TREM2 на первичные макрофаги, hMac стимулировали с помощью hT2AB, изотипического контроля или ацетилированного LDL в качестве положительного контроля с последующей оценкой хемокинов, высвобождаемых в культуральных супернатантах в различные моменты времени после стимуляции. hT2AB индуцировал зависящее от времени увеличение количества CCL4, высвобождаемого макрофагами человека (фиг. 1F), демонстрируя, что hT2AB активирует первичные макрофаги. Ранее авторы настоящего изобретения показали, что TREM2 обеспечивает выживаемость макрофагов в культурах с ограничивающими концентрациями CSF1 (30) и антителами TREM2 инструментальной мыши, которые индуцируют pSyk, а также повышают уровень выживаемости макрофагов *in vitro* в тех же условиях заражения (23). Таким образом, авторы настоящего изобретения также проверили, влияет ли hT2AB на уровень выживаемости макрофагов *in vitro* после отмены CSF1. Авторы настоящего изобретения получили макрофаги костного мозга (BMM) от мышей TREM2^{CV} путем культивирования с CSF1, а затем проверили их уровень выживаемости в присутствии или в отсутствие hT2AB через 48 часов после удаления CSF1 из среды (фиг. 1G). Действительно, hT2AB поддерживал выживаемость BMM

дозозависимым образом.

[00245] Наконец, авторы настоящего изобретения попытались определить, влияет ли ассоциированная с AD мутация R47H на связывание и/или передачу сигнала hT2AB. Во-первых, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что окрашенные hT2AB ВММ, полученные от мышей TREM2^{CV} и TREM2^{R47H} (фиг. 1H). Затем авторы настоящего изобретения проверили, может ли hT2AB индуцировать экспрессию GFP в Ca²⁺-NFAT-управляемой репортерной клеточной линии 2B4, стабильно трансфицированной либо TREM2^{CV}, либо TREM2^{R47H} вместе с DAP12 (фиг. 1I) (18). hT2AB индуцировал GFP в репортерных клетках, трансфицированных как TREM2^{CV}, так и TREM2^{R47H}. Более того, hT2AB поддерживал уровень выживаемости ВММ, полученных от мышей TREM2^{R47H}, культивируемых без CSF1 (фиг. 1J), убедительно демонстрируя, что hT2AB активирует как TREM2^{CV}, так и TREM2^{R47H}.

hT2AB может проникать через BBB и достигать эффективных концентраций в головном мозге.

[00246] Поскольку mAb, вводимые периферически, плохо проникают через гематоэнцефалический барьер (BBB), авторы настоящего изобретения провели фармакокинетические/фармакодинамические исследования для определения схемы дозирования, обеспечивающей эффективные концентрации hT2AB в головном мозге. Группам мышей TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} внутривенно (i.v.) вводили различные дозы hT2AB. Через 24 часа авторы настоящего изобретения измерили концентрации CXCL10, CCL4, CCL2, CXCL2 и CST7 с помощью MSD в лизатах головного мозга в качестве показателей активации микроглии. hT2AB усиливал все параметры в дозе от 30 до 100 мг/кг. (фиг. 2A-2E). Мыши TREM2^{R47H} были немного более чувствительными, чем мыши TREM2^{CV}. У мышей Trem2^{-/-} не было отмечено ответа выше исходного уровня. Динамика концентрации hT2AB в лизатах головного мозга после однократного i.v. инъекции 30 мг/кг мышам TREM2 R47H и Trem2^{-/-} показала, что концентрация hT2AB в головном мозге была в 25 раз выше, чем его EC50 в клетках клона G13 во все моменты времени (4, 8 и 24 часа) (фиг. 2F). Соответственно, повышение уровня мРНК CXCL10, CCL2, CCL4, CST7 и TMEM119 выявляли в лизатах головного мозга TREM2^{R47H}, но не Trem2^{-/-}, через 8 часов после инъекции и еще больше повышался через 24 часа (фиг. 2G-2K). Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что однократной инъекции hT2AB в дозе 30 мг/кг достаточно для активации микроглии *in vivo* в течение по меньшей мере 24 часов.

С помощью scRNA-seq выявляют четыре траектории микроглии у контрольных мышей TREM2^{CV}-5XFAD, получавших hIgG1.

[00247] Чтобы изучить влияние hT2AB на микроглию *in vivo*, авторы настоящего изобретения прибегли к scRNA-seq. Авторы настоящего изобретения вводили однократную дозу hT2AB или контрольного hIgG1 в брюшную полость 8-месячным мышам 5XFAD, скрещенным с мышами TREM2^{CV} (TREM2^{CV}-5XFAD) или TREM2^{R47H} (TREM2^{R47H}-5XFAD). Были включены как самки, так и самцы, и авторы настоящего

изобретения также вводили самкам мышей Trem2^{-/-} для контроля нецелевых эффектов hT2AB (фиг. 3А). Мышей умерщвляли через 48 часов после инъекции. С помощью оценки уровней антител в мозжечке подтвердили, что hT2AB проникает через BBB и достигает паренхимы головного мозга (таблица S1). Клетки CD45⁺ выделяли из коры головного мозга и подвергали scRNA-seq с использованием платформы 10x Genomics Chromium (фиг. 3А). 71303 клетки прошли строгий многоэтапный контроль качества (фиг. S1). Авторы настоящего изобретения применили контролируемый подход для первоначальной классификации клеток по основным подтипам иммунных клеток путем сопоставления профилей экспрессии отдельных клеток с сигнатурами генов ImmGen (31) (фиг. 3В). На основе профилей клеточной экспрессии было получено низкоразмерное латентное пространство, корректирующее ковариаты лечения, пола и генотипа, а также блокирующие технические помехи. График, кодирующий клеточные отношения, был создан с использованием коэффициента сходства Жаккара для ближайшего соседства каждой ячейки и непредвзято сегментирован с использованием способа обнаружения сообществ Лувена. Каждая клетка была отнесена к наиболее обогащенному типу клеток в своем сегменте, что привело к общей классификации 10 основных популяций иммунных клеток (фиг. 3С-3Е). Микроглия составляла более 90% от общего количества клеток. Остальные клетки состояли из Т-клеток, макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, В-клеток, нейтрофилов, циклирующих клеток, фибробластов, а также популяции клеток, которая имела смешанный профиль экспрессии макрофагов и Т-клеток (МФ:Т), возможно, улавливая взаимодействие Т-клеток, проникающих в головной мозг мышей, накапливающих Аβ (32). Микроглия по-разному экспрессировала общие маркерные гены, включая гены семейства P2ry12, Hexb, Tmem119 и Clq, среди прочих, которые отсутствовали в других клеточных популяциях (фиг. 3F-G). Эти гены также предпочтительно экспрессировались в небольшом кластере, идентифицированном как периваскулярные макрофаги, которые имели повышенную экспрессию Mrc1 и Pf4. Примечательно, что на моноциты и периваскулярные макрофаги не было обнаружено значительного влияния лечения hT2AB. Относительная фракция отобранных моноцитов или периваскулярных макрофагов у мышей, получавших контрольный hIgG1 или hT2AB, оставалась неизменной (соотношение hIgG1/hT2AB для моноцитов: TREM2^{CV}-5XFAD=1,3%/0,9%, TREM2^{R47H}-5XFAD=1,0%/0,9%, Trem2^{-/-}-5XFAD=0,7%/0,4%; макрофагов: TREM2^{CV}-5XFAD=3,0%/3,0%, TREM2^{R47H}-5XFAD=2,4%/2,4%, Trem2^{-/-}-5XFAD=2,3%/1,8%), и не было обнаружено дифференциальной экспрессии генов между когортами лечения (порог величины абсолютного эффекта > 1,5).

[00248] В таблице S1 показана концентрация hT2AB в мозжечке после однократной внутрибрюшинной инъекции. Анализ образцов с дозой hT2AB в сыворотке крови/головном мозге показал воздействие hT2AB, а соотношение BBB, проходящее через hT2AB, составляло около 0,19-0,76%. Генотипы: А=TREM2 CV -5XFAD; В=TREM2 R47H -5XFAD; С=Trem2^{-/-} - 5XFAD

Генотип	Пол	Лечение (48 ч)	hT2AB (нМ)	% соотношение
---------	-----	----------------	------------	---------------

			Сыворотка крови	Головной мозг	(концентрация Br/Sr)
A	M	hT2AB	2153,33	6,56	0,30
A	M	hT2AB	2020,00	3,75	0,19
A	F	hT2AB	394,67	2,98	0,76
A	F	hT2AB	2450,00	7,27	0,30
A	F	hT2AB	2793,33	7,53	0,27
B	M	hT2AB	1773,33	8,00	0,45
B	F	hT2AB	1733,33	4,18	0,24
B	F	hT2AB	1673,33	9,07	0,54
C	F	hT2AB	2100,00	7,20	0,34
C	F	hT2AB	1993,33	5,42	0,27
C	F	hT2AB	2280,00	5,69	0,25

[00249] Затем авторы настоящего изобретения определяли исходный уровень гетерогенности для 5694 клеток микроглии от контрольных мышей TREM2^{CV}-5XFAD, которым вводили hIgG1. Авторы настоящего изобретения применяли диффузионные карты, чтобы изучить низкоразмерное многообразие, лучше всего представляющее латентную временную ось в данных. Кластеризация с применением способа обнаружения сообществ Лувена выявила 11 состояний клеток, которые впоследствии были непредвзято размещены вдоль дерева максимальной экономии, напоминающего континуум активации ветвящихся клеток. Полученная траектория возникла из гомеостатической микроглии (с высокой экспрессией Tmem119, P2ry12, и Cx3cr1), прошла через 5 промежуточных стадий дифференцировки (t1-t5) и затем разветвилась на 4 различных терминальных типа: интерферон-чувствительная микроглия (IFN-R), МНС-II-экспрессирующая микроглия (МНС-II), циклирующая микроглия (Cyc-M) и стадия t6, которая в дальнейшем дифференцировалась в кластер DAM (фиг. 4A). Путем оценки сходства и неравенства транскриптома с DAM, описанным Керен-Шауль и др. (9), авторы настоящего изобретения обнаружили возрастающее сходство экспрессии вдоль траектории от t1 до t6 и кластеров DAM, описанных в настоящем документе, что привело к значительному сходству между терминальными DAM из обоих исследований (значение $P=1,4 \times 10^{-9}$; фиг. 4B). Авторы настоящего изобретения предсказали состояние клеточного цикла каждой клетки, применяя способ машинного обучения, который был обучен на парах экспрессии маркера состояния клеточного цикла (33). Cyc-M продемонстрировали значительное обогащение клеток (63,0%) в фазе G2/M во всех кластерах (средний процент в остальных кластерах=1,1%; фиг. 4C). Микроглия IFN-R наиболее обильно экспрессирует интерферон-стимулированные гены (ISG), такие как Bst2, Ifit3, Ifitm3 и Isg15 (фиг. 4D). Анализ обогащения терминов GO подтвердил экспрессию генной программы, индуцированную IFN, особенно IFN I типа, т. е. IFN α и IFN β (фиг. S2). Среди всех кластеров микроглия МНС-II экспрессировала самые высокие уровни генов пути МНС класса II вместе с классическими и неклассическими генами МНС класса I (фиг. 4E). Интересно, что это подмножество также экспрессировало высокие уровни GPI-связанных Cd52 и Lube, оба из которых были связаны с иммунорегуляцией (34). Примечательно, что ранее сообщалось о кластерах с отпечатками IFN и МНС-II в другой модели AD мышей

(35). В целом, имеющийся непредвзятый исходный анализ scRNA-seq микроглии у контрольных мышей TREM2^{CV}-5XFAD, получавших hIgG1, выявил четыре различных исхода в ответе микроглии на бляшки Аβ, которые могут отражать участие различных сигнальных путей.

Варианты TREM2 сильно влияют на траектории микроглии

[00250] Авторы настоящего изобретения намеревались провести комплексный анализ влияния пола, генотипа и лечения на дифференцирование типов DAM, Сус-М, IFN-R и МНС-II микроглии. С этой целью авторы настоящего изобретения применили подход, основанный на машинном обучении, для согласования выборок (фиг. S3) и вывели траектории от разветвленного кластера t5 к каждому конечному концу, подгоняя главные кривые на обученных нелинейных многообразиях всех ячеек из все условия (фиг. 5A). Используя данный способ, авторы настоящего изобретения сначала оценили исходное влияние генотипов TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD на траектории микроглии. Авторы настоящего изобретения особенно сосредоточились на самках, поскольку у них более выражено отложение Аβ, чем у самцов (27, 28). Кроме того, авторы настоящего изобретения включили мышей Trem2^{-/-}-5XFAD для дальнейшего сравнения. Авторы настоящего изобретения разделили траекторию каждого типа клеток на 10 псевдовременных интервалов одинакового размера и количественно определили количество клеток от контрольных леченных hIgG1 самок мышей за интервал. Доли клеточных популяций оценивали с применением способа начальной загрузки для учета технических различий между повторами (фиг 5B-E). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что для всех четырех терминальных временных интервалов у мышей TREM2^{CV}-5XFAD была самая высокая фракция клеток (расчетное среднее значение ± SE 95% CI DAM: 15,5 ± 0,1%, Сус-М: 13,9 ± 0,1%, IFN-R: 22,3 ± 0, 0,2%, МНС-II: 5,6 ± 0,1%). Это подтвердило, что TREM2 необходим для полной дифференцировки DAM, что согласуется с предыдущими исследованиями (9), и распространило эту концепцию на судьбы Сус-М, IFN-R и МНС-II, индуцированные накоплением Аβ. Мыши TREM2^{R47H}-5XFAD содержали больше DAM поздней стадии и клеток МНС-II (DAM: 7,3 ± 0,1%, Сус-М: 4,1 ± 0,1%, IFN-R: 10,3 ± 0,1%, МНС-II: 1,7 ± 0,1%), чем у мышей Trem2^{-/-}-5XFAD (DAM: 5,0 ± 0,0%, циклирующая: 4,8 ± 0,1%, IFN-R: 12,7 ± 0,1%, МНС-II: 0,0 ± 0,0%). Это согласуется с предыдущими выводами о том, что мутант TREM2^{R47H}, хотя и гипоморфный, представляет собой частичную потерю функции с ограниченной способностью индуцировать созревание DAM (19). Поскольку TREM2^{R47H} плохо связывает липидные лиганды, постоянное взаимодействие TREM2 с эндогенными лигандами необходимо для поддержания дифференцировки DAM и, в меньшей степени, микроглии МНС-II.

Микроглия самок предрасположена к исходу IFN-R у контрольных мышей TREM2^{CV}-5XFAD, получавших hIgG1

[00251] Авторы настоящего изобретения сравнивали влияние пола на траектории микроглии у мышей TREM2^{CV}-5XFAD. Авторы настоящего изобретения не наблюдали разницы в пропорциях DAM поздних стадий (расчетное среднее значение ± SE 95% CI

самки: $15,5 \pm 0,1\%$, самцы: $14,5 \pm 0,1\%$; фиг. S4A). Однако представление Сус-М, IFN-R и, в меньшей степени, типов клеток МНС-II было смещенным. Относительная фракция клеток в терминальном интервале Сус-М (фиг. S4B) и IFN-R (фиг. S4C) была значительно выше у самок, чем у самцов (Сус-М самки: $13,9 \pm 0,1\%$, самцы: $8,1 \pm 0,1\%$; IFN-R самки: $22,3 \pm 0,2$, самцы: $17,0 \pm 0,2$). Предполагаемые терминальные фракции клеток МНС-II указывают на умеренную тенденцию этого типа клеток быть более многочисленным у самцов, чем у самок (самки: $5,6 \pm 0,1\%$, самцы: $8,0 \pm 0,2\%$; фиг. S4D).

[00252] Авторы настоящего изобретения также оценивали динамику экспрессии 10 лучших сигнатурных генов для каждого терминального типа до и после ветвящегося кластера $t5$. (фиг. S4A-S4D). Экспрессия генов была смоделирована как функция псевдовремени с использованием обобщенных аддитивных моделей с отрицательным биномом (36). Это позволяет оценивать паттерны экспрессии генов по всей линии траектории дифференцирования на уровне одной клетки и, следовательно, независимо от плотности выборки клеток. Для каждого типа клеток сигнатурные гены показали схожий последовательный паттерн повышающей регуляции по отношению к терминальному концу каждой траектории у обоих полов. Это означает, что типы микроглии демонстрируют одинаковый состав транскриптома и, таким образом, потенциально выполняют качественно идентичные функции у самцов и самок. Тем не менее, микроглия может быть подготовлена по-разному, вызывая более динамичный ответ микроглии, что в конечном итоге приводит к количественному сдвигу в ландшафте популяции микроглии между полами. Например, исходный уровень экспрессии интерферон-стимулируемого гена *Ifi2712a* был повышен у самок мышей по траектории Сус-М и IFN-R (критерий Вальда на ранние и поздние терминальные различия: Сус-М P -значение раннее $= 9,9 \times 10^{-9}$, поздние $= 3,8 \times 10^{-1}$, P -значение IFN-R раннее $= 1,0 \times 10^{-4}$, поздние $= 1,8 \times 10^{-2}$; фиг. S4B). *Ifi2712a* является регулятором транскрипционной активности ядерных рецепторов NR4A, которые координируют клеточные и системные метаболические процессы (37), а также дифференцировку миелоидных клеток и их ответ на воспалительные стимулы (38-40). Индуцированный исходный уровень экспрессии *Ifi2712a* может указывать на повышенное воздействие на клетки патофизиологических сигналов окружающей среды. Фактически, предыдущие исследования показали, что самки мышей 5XFAD накапливают больше А β , чем самцы мышей 5XFAD (27, 28). Соответственно, авторы настоящего изобретения также обнаружили больше нерастворимого А β в головном мозге самок, чем самцов мышей TREM2^{CV}-5XFAD. (фиг. S4E). Таким образом, в совокупности эти данные предполагают, что обогащение типов IFN-R и Сус-М у самок мышей TREM2^{CV}-5XFAD отражает ответ микроглии на более обильные агрегаты А β .

Влияние hT2AB на цикличность, исход IFN-R и МНС-II зависит от предшествующего состояния микроглии

[00253] Затем авторы настоящего изобретения изучили, как hT2AB влияет на судьбу микроглии по сравнению с контрольным hIgG1 у мышей TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD обоих полов. Чтобы учесть внешние эффекты лечения, авторы

настоящего изобретения включали данные о мышах Trem2^{-/-}-5XFAD, соответствующих лечению. hT2AB не индуцировал экспансию DAM (оценочное соотношение контрольных фракций клеток hIgG1 и hT2AB в 90-100% псевдвременном интервале, R, самок TREM2^{CV}/TREM2^{R47H}/Trem2^{-/-}-5XFAD: R=0,6/1,0/0,9, самцов : R=1,0/1,0/н.о.). Интересно, что обработка hT2AB мышей TREM2^{CV}-5XFAD активировала повторный вход микроглии в клеточный цикл у самцов (R=4,2), но микроглия не подвергалась дополнительной индукции клеточного цикла у самок (R=0,5; фиг. 6A). Повышенная величина пролиферативного ответа на hT2AB была очевидна в микроглии от TREM2^{R47H}-5XFAD, поскольку эта популяция увеличивалась как у самок, так и у самцов мышей (самки: R=4,9, самцы: R=7,9). Аналогично, hT2AB индуцировал терминальную популяцию IFN-R у самцов TREM2^{CV}-5XFAD (R=1,3), самцов TREM2^{R47H}-5XFAD (R=2,1) и самок TREM2^{R47H}-5XFAD (R=3,2), но не способствовал этому клеточному исходу у самок TREM2^{CV}-5XFAD (R=0,9). Учитывая, что контрольные мыши TREM2^{R47H}-5XFAD, обработанные hIgG1, имеют меньше микроглии Cys-M и IFN-R, чем мыши TREM2^{CV}-5XFAD, и аналогичная диспропорция очевидна между самцами и самками TREM2^{CV}-5XFAD, полученные результаты позволяют предположить, что hT2AB активирует как пролиферацию микроглии, так и дифференцировка IFN-R либо при действии в качестве суррогатного лиганда для TREM2^{R47H}, либо при ограниченном накоплении A. hT2AB, по-видимому, не увеличивает процент активированной микроглии, кроме надежной индукции этих состояний активации у самок мышей 5XFAD, несущих TREM2^{CV}, что согласуется с предыдущими описаниями сильно повышенных сигнатур DAM у животных 5XFAD, несущих TREM2 дикого типа. Микроглия МНС-II, которая была относительно немногочисленной у мышей TREM2^{CV}-5XFAD обоих полов (хотя их было больше у самцов, чем у самок), подверглась индуцированной hT2AB экспансии у обоих полов, но ответ был более выражен у самок (самки: R=4,9, самцы: R=1,9). Точно так же hT2AB увеличивал популяции МНС-II поздней стадии у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD обоих полов (оценочное соотношение контрольных фракций клеток hIgG1 и hT2AB в псевдвременном интервале 80-100% самок: 4,1, самцов: 2,1). В целом, hT2AB запускал повторный вход в клеточный цикл микроглии и пополнял пулы клеток IFN-R и МНС-II у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD. У мышей TREM2^{CV}-5XFAD hT2AB-индуцированные эффекты были обусловлены ранее существовавшими композициями типов клеток в сторону восстановления менее многочисленных популяций.

Антитело к TREM2 ко-стимулирует экспрессию отдельных генов в терминальных типах микроглии.

[00254] Поскольку полученные данные описывают континуум развития, кластеры микроглии представляют собой смесь клеток, каждая из которых включает дискретное количество, захваченное на разных стадиях развития. Таким образом, при сравнении клеточных кластеров различия в экспрессии генов могут быть скрыты. Чтобы избежать этой проблемы, авторы настоящего изобретения подобрали динамику экспрессии генов каждой клетки по мере того, как она дифференцируется от точки ветвления к

терминальному фенотипу. Полученная модель экспрессии не зависела от отобранных клеточных фракций по всей линии траектории, что позволило авторам настоящего изобретения точно определить лежащую в основе дифференциальную экспрессию генов. Надежно обнаруженные гены были отфильтрованы по траектории. Авторы настоящего изобретения статистически сравнивали раннее начало и поздний конец каждой линии между hT2AB и контрольными мышами, обработанными hIgG1.(фиг. 6B). Большинство hT2AB-индуцированных изменений экспрессии генов происходило на ранней стадии псевдвременной траектории (в среднем=76,8%), тогда как лишь небольшая часть этих изменений проявлялась в терминальном типе клеток (в среднем=19,1%). Это указывает на то, что транскрипционные сдвиги в основном временные, и что hT2AB действует как костимулятор, а не как модификатор транскрипции терминальных фенотипов микроглии. Далее авторы настоящего изобретения обнаружили, что в среднем 63,3% транскрипционных ответов на траекторию были применимы к микроглии, несущей гипоморфную форму TREM2^{R47H}, которая менее эффективно связывает эндогенные лиганды, но может активироваться hT2AB; это указывает на зависимый от состояния активации эффект hT2AB на исход микроглии. Интересно, что наибольшее количество hT2AB-индуцированных изменений экспрессии генов было обнаружено на траектории DAM (среднее количество генов/общее количество проанализированных: DAM=552/1735, Cys-M=321/3353, IFN-R=187/5005, MHC -II=148/4508), что указывает на то, что эта траектория стимулировалась, но лечение hT2AB не приводило к полной дифференцировке клеток до терминального фенотипа в ходе этого эксперимента. В целом изменения транскрипции не приводили линейно к экспансии терминальных типов клеток из-за их зависимости от статуса дифференцирования до стимуляции, опосредованной hT2AB.

Краткосрочное лечение mT2AB влияет на маркеры пролиферации и активации микроглии в TREM2^{R47H}-5XFAD.

[00255] Затем авторы настоящего изобретения попытались определить влияние обработки антителом к TREM2 на биохимические и гистологические маркеры головного мозга у животных с 5XFAD.. Для этой цели авторы настоящего изобретения использовали химерный вариант hT2AB с константной областью мышиного IgG1 (mT2AB). 5-месячным мышам TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD обоих полов вводили mT2AB или контрольный mIgG1 в дозе 30 мг/кг в брюшную полость каждые 3 дня в течение 10 дней.(фиг. 7A). По окончании экспериментов головной мозг делили на две половины: одну половину лизировали для биохимического определения растворимых маркеров активации и пролиферации микроглии, включая хемокины и цитокины, а также A β -пептиды 1-40 и 1-42; вторая половина была сделана для анализа покрытия A β с помощью конфокальной микроскопии с использованием антитела к A β и метокси-04.. Изменения уровня хемокинов и цитокинов у трансгенных мышей hTREM2 на фоне 5XFAD соответствовали тем, которые первоначально наблюдали у трансгенных мышей hTREM2 на фоне дикого типа (фиг. 2), с индукцией CCL4, CXCL10 и IL-1 β , наблюдаемой у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD (фиг. 7B).Примечательно, что mT2AB индуцировал уровни CCL4,

CXCL10 и IL-1 β у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD, сравнимые с уровнями, наблюдаемыми у мышей TREM2^{CV}-5XFAD (фиг. 7B). Учитывая, что CCL4, CXCL10 и IL-1 β продуцируются микроглией, эти наблюдения согласуются с наблюдениями при scRNA-seq за повышенной пролиферацией и активацией, особенно микроглии, экспрессирующей вариант TREM2^{R47H}. Количественное определение A β выявило повышенный уровень отложения амилоида у самок по сравнению с самцами у мышей как TREM2 CV, так и TREM2 R47H (фиг. S5A). Этот результат подтвердил предыдущие наблюдения (25, 26) и распространил их на мышей, несущих TREM2 человека, что дает потенциальное объяснение более значительного относительного увеличения генов ответа на активацию микроглии у самцов, наблюдаемого после лечения с помощью hT2AB. Краткосрочное лечение с помощью mT2AB не оказало заметного влияния на общее количество бляшек или растворимого A β как у самцов, так и у самок мышей, что было измерено с помощью биохимической оценки нагрузки растворимого или нерастворимого A β (фиг. S5A) и окрашивания антителом к A β и метокси-04 (фиг. S5B-C). Это согласуется с недавними исследованиями, в которых более длительное лечение антителами-агонистами TREM2 приводило к надежной индукции барьерной функции микроглии и предупреждению последующей нейротоксичности без изменения общего количества амилоида (25). Возможно, что различия в ответе микроглии на амилоид или другие патологии AD могут пролить свет на исторические наблюдения о том, что общая амилоидная нагрузка плохо коррелирует с когнитивными функциями и что высокие уровни отложений амилоида могут наблюдаться у когнитивно нормальных пожилых людей (41, 42).

7.1.5. Обсуждение

[00256] В этом исследовании авторы настоящего изобретения исследовали влияние отложения амилоида и антитела-агониста к TREM2 человека на активацию микроглии, пролиферацию и экспрессию генов у мышей TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD. Сначала авторы настоящего изобретения установили одноклеточный профиль микроглии с высоким разрешением у контрольных мышей TREM2^{CV}-5XFAD, обработанных hIgG1, продемонстрировав, что микроглия постепенно дифференцируется из гомеостатического состояния в 4 различных типа в ответ на накопление A β . Эти типы включают ранее описанный DAM (9), IFN-R, MHC-II (35), а также микроглию Cys-M. Авторы настоящего изобретения показали, что относительное распределение типов микроглии зависит от генотипа TREM2 и пола мыши. У мышей, не получавших hT2AB, TREM2^{CV} требовался для оптимальной дифференцировки всех типов, которые, наоборот, были недостаточно представлены у мышей, несущих вариант TREM2^{R47H}. Кроме того, микроглия IFN-R и Cys-M была более распространена у самок, чем у самцов мышей TREM2^{CV}-5XFAD, что, скорее всего, отражает повышенное накопление A β у самок. Затем авторы настоящего изобретения установили влияние hT2AB на исход микроглии, продемонстрировав два основных эффекта: hT2AB способствовал экспансии микроглии Cys-M у мышей с более низкой исходной пролиферацией, в том числе мышей TREM2^{R47H}-5XFAD обоих полов и мышей-самцов TREM2^{CV}-5XFAD; более того, hT2AB пополнял пулы клеток IFN-R и

МНС-II у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD. Наконец, в краткосрочной многодозовой схеме mT2AB приводил к повышенному содержанию хемокинов в головном мозге у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD, что соответствовало индуцированной hT2AB экспансии микроглии.

[00257] Одним из важных выводов полученного исследования является то, что активность TREM2 кажется насыщаемой. Мыши, экспрессирующие TREM2^{R47H}, который неспособен эффективно связывать физиологические лиганды, имели явный дефект в циклах микроглии. Однако взаимодействие TREM2^{R47H} с суррогатным лигандом, таким как hT2AB, заметно увеличивало пролиферацию микроглии. Аналогичный результат был недавно подтвержден с другим mAb к TREM2 человека (25). Напротив, у мышей, экспрессирующих TREM2^{CV}, который связывает эндогенные лиганды и способствует нормальной исходной пролиферации, hT2AB способствует лишь умеренному увеличению цикла микроглии самцов, которая имеет тенденцию к меньшей пролиферации, чем микроглия самок, из-за меньшего воздействия накопления Aβ. Это наблюдение важно для будущего терапевтического применения антител к TREM2, поскольку оно предполагает, что эти антитела могут восстанавливать состояние нарушенной активации, наблюдаемое у пациентов с гипофункциональными мутациями в TREM2 или у которых иным образом не удастся вызвать устойчивый ответ DAM, как это наблюдали в посмертном головном мозге человека при AD. Это также предполагает, что активация микроглии агонистами TREM2 с меньшей вероятностью происходит в отсутствие повреждающих стимулов, таких как Aβ или чередующиеся физиологические лиганды TREM2.

[00258] Ранее было показано, что TREM2 необходим для индукции полной дифференцировки DAM (9). В соответствии с этим у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD и Trem2^{-/-}-5XFAD было меньше DAM. Полученные данные распространяют эту концепцию на микроглию IFN-R и МНС-II, которые также были менее распространены у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD и Trem2^{-/-}-5XFAD, чем у мышей TREM2^{CV}-5XFAD. Важно отметить, что имеющееся исследование также демонстрирует, что передача сигналов TREM2, хотя и необходима, но недостаточна для индукции различных терминальных типов микроглии, что согласуется с предыдущими сообщениями о двухэтапной активации фенотипа DAM (9). Судьба клеток микроглии сначала определяется смещением нейропатологических состояний, которые запускают сигнальные пути, которые разветвляются и кооптируют TREM2 для поддержания экспансии по отношению к четырем терминальным типам клеток. Соответственно, hT2AB индуцирует транскрипционные изменения проксимальнее точки ветвления, как только принимается решение о клеточном исходе, указывая на то, что hT2AB может стимулировать общие пути на каждой траектории, которые способствуют прогрессированию по отношению к терминальным типам микроглии. Учитывая предыдущую демонстрацию авторов настоящего изобретения того, что TREM2 поддерживает путь mTOR, передача сигналов TREM2 может костимулировать предварительно активированные пути, обеспечивая строительные блоки и энергию, необходимые для ответов микроглии на Aβ или другие повреждения (43).

[00259] В краткосрочной многодозовой схеме, состоящей из частого введения

высоких доз mAb в течение 10 дней, mT2AB индуцировал ответы, соответствующие пролиферации и активации микроглии, которые различались генотипом и полом TREM2, предположительно в связи со сниженными уровнями вовлечения TREM2 в TREM2^{R47H} мышей-самцов. Полученный отчет согласуется с недавним исследованием, в котором длительное лечение мышей TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD другим mAb к TREM2 человека привело к увеличению метаболически активных и пролиферирующих популяций микроглии в большей степени у TREM2^{R47H}-5XFAD, чем у мышей TREM2^{CV}-5XFAD (25), и в 12-недельной экспериментальной парадигме привели к изменениям, согласующимся с индукцией более эффективного ответа микроглиального барьера, включая изменения в уплотнении бляшек, изменения ассоциации микроглии и бляшек и уменьшение дистрофии нейритов, согласующееся со снижением нейротоксичности Aβ.

[00260] В заключение, полученная оценка mAb hT2AB к TREM2 человека *in vivo* показывает, что системное введение этого антитела в TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD *in vivo* 1) пополняло пулы Сус-М, IFN-R и МНС-II у мышей TREM2^{R47H}-5XFAD; 2) приблизило представление микроглии самцов Сус-М и IFN-R к представлению самок у мышей TREM2^{CV}-5XFAD, у которых переход микроглии уже был сильно активирован; и 3) ко-стимулированные общие пути в каждой траектории, которые облегчают продвижение к терминальным типам микроглии.

7.1.6. Литературные источники

[00261] Конкретные ссылки, приведенные ниже и обсуждаемые в настоящем документе, включены в полном объеме.

1. J. M. Long, D. M. Holtzman, Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 1-28 (2019).
2. D. J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595-608 (2016).
3. M. T. Heneka, Microglia take centre stage in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 79-80 (2019).
4. R. E. Tanzi, L. Bertram, Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 120, 545-555 (2005).
5. C. M. Karch, A. M. Goate, Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* 77, 43-51 (2015).
6. S. Carmona, J. Hardy, R. Guerreiro, The genetic landscape of Alzheimer disease, 1st Ed. (Elsevier B.V., 2018).
7. I. E. Jansen, et al., Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat. Genet.* 51, 404-413 (2019).
8. P. Yuan, et al., TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* 90, 724-739 (2016).
9. H. Keren-Shaul, et al., A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17 (2017).

10. S. Krasemann, et al., The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47, 566-581.e9 (2017).
11. Y. Zhou, et al., Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 131-142 (2020).
12. K. Srinivasan, et al., Alzheimer's Patient Microglia Exhibit Enhanced Aging and Unique Transcriptional Activation. *Cell Rep.* 31, 107843 (2020).
13. T. K. Ulland, M. Colonna, TREM2 - a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 667-675 (2018).
14. P. Wunderlich, et al., Sequential proteolytic processing of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) protein by ectodomain shedding and γ -secretase-dependent intramembranous cleavage. *J. Biol. Chem.* 288, 33027-33036 (2013).
15. P. Thornton, et al., TREM 2 shedding by cleavage at the H157- S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease- associated H157Y variant . *EMBO Mol. Med.* 9, 1366-1378 (2017).
16. R. Guerreiro, et al., TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117-127 (2013).
17. T. Jonsson, et al., Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107-116 (2013).
18. Y. Wang, et al., TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061-1071 (2015).
19. W. M. Song, et al., Humanized TREM2 mice reveal microglia-intrinsic and -extrinsic effects of R47H polymorphism. *J. Exp. Med.* 215, 745-760 (2018).
20. Y. Wang, et al., TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J. Exp. Med.* 213, 667-675 (2016).
21. T. R. Jay, et al., Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 37, 637-647 (2017).
22. C. Y. D. Lee, et al., Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models. *Neuron* 97, 1032-1048.e5 (2018).
23. Q. Cheng, et al., TREM2-activating antibodies abrogate the negative pleiotropic effects of the Alzheimer's disease variant Trem2 R47H on murine myeloid cell function. *J. Biol. Chem.* 293, 12620-12633 (2018).
24. K. Schlepckow, et al., Enhancing protective microglial activities with a dual function TREM 2 antibody to the stalk region . *EMBO Mol. Med.* 12 (2020).
25. S. Wang, et al., Anti-human TREM2 induces microglia proliferation and reduces pathology in an Alzheimer's disease model. *J. Exp. Med.* 217 (2020).
26. H. Oakley, et al., Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in

amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129-10140 (2006).

27. K. R. Sadleir, W. A. Eimer, S. L. Cole, R. Vassar, A β reduction in BACE1 heterozygous null 5XFAD mice is associated with transgenic APP level. *Mol. Neurodegener.* 10, 1-16 (2015).

28. S. Bhattacharya, C. Haertel, A. Maelicke, D. Montag, Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 9, 1-12 (2014).

29. M. J. Mendez, et al., Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat. Genet.* 15, 146-156 (1997).

30. K. Otero, et al., Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and β -catenin. *Nat. Immunol.* 10, 734-743 (2009).

31. T. S. P. Heng, et al., The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* 9, 1091-1094 (2008).

32. D. Gate, et al., Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Nature* 577, 399-404 (2020).

33. A. Scialdone, et al., Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods* 85, 54-61 (2015).

34. X. Xu, et al., IFN-Stimulated Gene LY6E in Monocytes Regulates the CD14/TLR4 Pathway but Inadequately Restrains the Hyperactivation of Monocytes during Chronic HIV-1 Infection. *J. Immunol.* 193, 4125-4136 (2014).

35. H. Mathys, et al., Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 21, 366-380 (2017).

36. K. Van den Berge, et al., Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. *Nat. Commun.* 11, 1-13 (2020).

37. K. Kurakula, D. S. Koenis, C. M. van Tiel, C. J. M. de Vries, NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 2543-2555 (2014).

38. R. N. Hanna, et al., The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁻ monocytes. *Nat. Immunol.* 12, 778-785 (2011).

39. N. Ipseiz, et al., The Nuclear Receptor Nr4a1 Mediates Anti-Inflammatory Effects of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* 192, 4852-4858 (2014).

40. C. K. Glass, K. Saijo, Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 365-376 (2010).

41. R. D. Terry, et al., Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572-580 (1991).

42. K. M. Rodrigue, K. M. Kennedy, D. C. Park, Beta-amyloid deposition and the aging brain. *Neuropsychol. Rev.* 19, 436-450 (2009).

43. T. K. Ulland, et al., TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* 170, 649-663.e13 (2017).

44. L. L. Green, et al., Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice

engineered with human Ig heavy and light chain YACs. Nat. Genet. 7, 13-21 (1994).

45. W. Song, et al., Alzheimer's disease-associated TREM2 variants exhibit either decreased or increased ligand-dependent activation. Alzheimer's Dement. 13, 381-387 (2017).

7.1.7. Способы

Животные

[00262] Мышей TREM2^{CV}-5XFAD и TREM2^{R47H}-5XFAD получали, как описано ранее (19). Мышей содержали в помещениях для животных Вашингтонского университета в Сент-Луисе. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Институциональными правилами, в соответствии с утвержденными протоколами № 20160220 и 19-0981, одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Вашингтонского университета и Amgen South San Francisco. Для фармакокинетического и фармакодинамического анализа использовали только самцов мышей, а в этом исследовании анализ scRNA-seq проводили как на самцах, так и на самках мышей.

Получение полностью человеческих антител к hTREM2

[00263] Полностью человеческие (hT2AB) и мышьиные (mT2AB) антитела к hTREM2 были получены путем иммунизации трансгенных мышей XMG2-K и XMG2-KL Xenomouse® (29, 44) с помощью кДНК, кодирующей человеческий TREM2 и DAP12.. Селекцию и генерацию антител проводили, как описано в разделе «*Способы SI*».

Анализ фосфорилирования Syk для оценки активации TREM2

[00264] Для оценки активности антител применяли стабильную клеточную линию на основе HEK293, экспрессирующую hTREM2 и hDAP12 (клон G13) или hMac, как описано в разделе «*Способы SI*». Активность антител (стимуляция) была представлена как кратность контроля (S/B): S/B=сигнал образца pSyk (число импульсов)/базальный сигнал pSyk (число сигналов изотипического контроля pSyk). EC₅₀ для hT2AB определяли с помощью четырехпараметрической логистической модели GraphPad Prism версии 6.07.

Измерение уровней sTREM2 и CCL4 в hMac с помощью MSD

[00265] hMac применяли для измерения CCL4 и sTREM2 в кондиционированных средах после обработки антителами контроля изотипа hT2AB или hIgG1, как описано в разделе «*Способы SI*». Ацетилированные LDL использовали в качестве положительного контроля для каждой группы измерения CCL4.

Анализ уровня выживания BMM

[00266] BMM из TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} собирали на день 5 культивирования с CSF1 и переносили в 24-луночные плоскодонные планшеты, в которых были связаны hT2AB или контрольный hIgG1 в количестве 5×10^4 клеток/лунку в полной RPMI без CSF1. Уровень выживаемости, измеренный как % популяции PI-отрицательных клеток, определяли через 48 часов культивирования с помощью FACSCalibur.

Репортерный анализ GFP

[00267] Были описаны репортерные клетки 2B4 NFAT:GFP, экспрессирующие hTREM2^{CV} и hTREM2^{R47H} (45), и их применяли для проверки активации вариантов

hTREM2, как описано в разделе «Способы SI».

Фармакодинамика и фармакокинетика hT2AB

[00268] Фармакодинамический анализ hT2AB проводили, как описано в разделе «Способы SI». Для фармакокинетического анализа группам 8-месячных мышей TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} самцов или самок вводили i.p. однократной инъекцией 30 мг/кг hT2AB. Концентрации hT2AB в образцах сыворотки крови мыши и в гомогенате мозжечка, перфузированного холодным PBS, измеряли через 48 часов с помощью двух разных анализов. Оба анализа представляли собой сэндвич-иммуноанализы с использованием рекомбинантного TREM2 человека (Amgen, Inc., штат Калифорния) и конъюгированного с рутением моноклонального антитела мыши к Fc человека (Amgen, Inc., штат Калифорния). Нижний предел количественного определения (LLOQ) для анализа гомогената сыворотки крови и мозжечка составлял 100 нг/мл и 1 нг/мл, соответственно.

Одноклеточное РНК-секв.

[00269] Восьмимесячным мышам инъецировали i.p. hT2AB или контрольный hIgG1 в дозе 30 мг/кг за 48 часов до умерщвления. После перфузии холодным PBS кору головного мозга диссоциировали, клетки Cd45+ сортировали с помощью FACS. Все библиотеки клеток CD45+ были подготовлены с использованием набора для экспрессии генов 10x Genomics Chromium Single Cell 3' v2 Gene Expression Kit и секвенированы на проточных кюветах Illumina NovaSeq 6000 для достижения глубины считывания 50 000 ридов на ячейку. Данные были проанализированы, как описано в разделе «Способы SI». Образцы, которые не подвергали воздействию hT2AB, исключали из последующих анализов. Данные секвенирования и отчеты о качестве образцов можно получать в Gene Expression Omnibus под серийным номером GSE156183.

Иммуоокрашивание для Aβ и анализ изображений

[00270] Свободно плавающие срезы головного мозга использовали для иммуоокрашивания Aβ, как описано в разделе «Способы SI». Конфокальные изображения были получены на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon A1Rsi+ с использованием объектива 20 × 0,95-NA. Были записаны z-стеки с шагом 1,1 мкм в направлении z, разрешением 1024 × 1024 пикселей. Процент покрытия области Aβ был рассчитан автоматически путем пакетной обработки в ImageJ.

Количественное определение Aβ и хемокинов/цитокинов

[00271] Aβ₁₋₄₀ и Aβ₁₋₄₂ человека измеряли с помощью набора MSD V-plex 6E10 (Meso Scale Discovery), а мышинные IL-1β, CXCL10 (IP-10) и CCL4 (MIP-1β) измеряли с помощью анализа с U-plex biomarker group 1 от MSD (Meso Scale Discovery), как описано в разделе «Способы SI».

Статистический анализ

[00272] Все графики представляют собой среднее значение всех образцов в каждой группе ± SD или SEM, как указано в подписях к фигурам. Программное обеспечение GraphPad Prism (v8) применяли для проведения статистического анализа. P < 0,05

считалось значимой разницей между различными группами лечения, определяемой с помощью двухфакторного ANOVA с тестом множественных сравнений Сидака, если не указано иное.

7.1.8. Дополнительные Способы (Способы SI)

Животные

[00273] Мышей содержали в помещениях для животных Вашингтонского университета в Сент-Луисе. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Институциональными правилами, в соответствии с утвержденными протоколами № 20160220 и 19-0981, одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Вашингтонского университета и Amgen South San Francisco. Для фармакодинамического анализа использовали только самцов мышей, в этом исследовании фармакокинетический анализ и анализ scRNA-seq проводили как на самцах, так и на самках мышей.

Антитела к hTREM2

[00274] hTREM2-специфические титры в сыворотке крови, полученные от иммунизированных мышей, отслеживали с помощью анализа FACS живых клеток (Accuri FACS). Лимфоциты из дренирующих лимфатических узлов животных с самыми высокими антиген-специфическими нативными титрами сыворотки, направленными против hTREM2, применяли для получения гибридом. Супернатанты гибридом проверяли в отношении связывания с TREM2 человека с помощью ELISA с использованием 384-луночных планшетов, покрытых нейтравидином в течение ночи или покрытых контрольным hIgG1 в концентрации 2 мкг/мл при 37°C в течение 1 часа с последующим покрытием биотинилированным внеклеточным доменом hTREM2, слитым с частью Fc hIgG1 Fc (hTREM2-Fc, Amgen). После стадии промывки истощенные супернатанты гибридомы разводили 1% молока/1X PBS (1:5) и добавляли в 384-луночные планшеты, покрытые hTREM2-Fc или контрольным hIgG1, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Для обнаружения применяли смесь козьего α -человеческого к-HRP (2060-05, Southern Biotech) и козьего α -человеческого λ -HRP (2070-05, Southern Biotech). Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей от ведущего кандидата, идентифицированного в ходе кампании по скринингу гибридом, клонировали и рекомбинантно экспрессировали с константной областью hIgG1, лишенной эффекторной функции, с получением hT2AB. Муринизированную версию hT2AB, mT2AB, получали путем прививки варибельных доменов hT2AB на безэффекторный скелет mIgG1. Препараты hT2AB, mT2AB и изотипического контроля без эффектора hIgG1 и контрольного mIgG1, применяемые в экспериментах на животных и клетках, тестировали в отношении эндотоксина, и было обнаружено, что они сопоставимы с <0,5 EU/мг, что подтверждает, что ответы не были связаны с передачей сигналов TLR.

Анализ связывания антител

[00275] Очищенный hT2AB разбавляли до 5 мкг/мл в буфере для анализа (10 mM трис, 0,13% тритон X-100, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,6) и улавливали

на кинетических сенсорах с антителом к hFc (18-5090, ForteBio). Рекомбинантный hTREM1:GSS:метка:6xHis и рекомбинантный hTREM2:GSS:метка:6xHis подвергали минимальному биотинилированию (0,3-0,4 биотина/моль) и иммобилизовали при 70-80 нМ на высокоточных волоконно-оптических биосенсорах со стрептавидином (SAX, № 18-5119) более 2000 секунд до конечного уровня нагрузки ~ 2 нм. Затем каждый загруженный белок TREM2 инкубировали с серией разбавлений белка hT2AB Fab (30, 10, 3,3 нМ) в течение 300 секунд, а затем в течение 500 секунд только в буфере (диссоциация). Необработанные данные были обработаны с помощью программного обеспечения для анализа данных Octet (вер. 10), и обработанные данные были глобально приспособлены к модели связывания 1:1, и была рассчитана константа диссоциации (KD) 50 нМ. Антитело к hTREM1 и контрольное антитело hIgG2 соответствующего изотипа применяли в качестве контролей. Чтобы проверить способность связывания с мутацией hTREM2R47H, макрофаги костного мозга (BMM) от мышей TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} собирали на день 5 и инкубировали в буфере FACS (10% FCS в PBS) с hT2AB или контрольным hIgG1 в течение 30 мин с последующим окрашиванием Fc-PE к hIgG (9040-09, SouthernBiotech). Мертвые клетки исключали окрашиванием DAPI.

Генерация дифференцированных макрофагов, происходящих из моноцитов человека

[00276] С помощью лейкофереза и отрицательной иммуномагнитной селекции (Lonza) собирали большие, единичные донорские партии (50-100 миллионов клеток на цикл дифференцировки) криоконсервированных моноцитов CD14⁺ от здоровых людей, деидентифицированных доноров, и применяли для создания макрофагов (hMac). Суспензии криовыделенных моноцитов дифференцировали в среде RPMI-1640 с использованием рекомбинантного M-CSF растительного происхождения (50 нг/мл, растительного происхождения, ультранизкий уровень эндотоксина 0,05 EU/мкг, PromoCell, № C-60442A) полу-адгезивным образом с биотехнологическими мешками CellGenix VueLife 118-C (Saint-Gobain Performance Plastics). Максимум 50 миллионов клеток загружали в среду для дифференцировки в каждый мешок (~30 мл исходной загрузки клеточной суспензии). Среда для дифференцировки состояла из RPMI-1640+10% FBS (сертифицировано Gibco PerformancePlus, инактивировано нагреванием, ≤5 EU/мл эндотоксина, № 10082139), 1X GlutaMAX (Gibco, № 35050061), 1X пен./стреп. (Gibco, № 15140122), 1X NEAA (Gibco, № 11140050) и 1X пируват натрия (Gibco, № 11360070) в дополнение к 50 нг/мл M-CSF. С мешками, размещенными на штативах в стандартных инкубаторах для культур тканей (влажный, 5% CO₂, 37 градусов C) для максимального газообмена, дифференцировку проводили в общей сложности в течение 9 дней с инфузиями свежей среды для дифференцировки на день 3 и 6. После 9 дней дифференцировки макрофаги собирали из биотехнологических пакетов после перемешивания для удаления клеток и криоконсервировали в среде VamBanker Serum Free Medium (Wako Chemicals USA, № 30214681). Каждая крупномасштабная производственная серия макрофагов человека была качественно проверена в отношении

постоянной экспрессии TREM2 по сравнению с недифференцированными моноцитами с помощью проточной цитометрии. На протяжении всего процесса производства были предприняты все усилия для контроля и сведения к минимуму воздействия эндотоксинов.

Анализ фосфорилирования Syk

[00277] Клетки клона G13 (8×10^5 клеток/мл) или hMac (2×10^5 клеток/мл) высевали в течение ночи по 25 мкл на лунку в 384-луночный планшет для анализа, покрытый PDL. В день анализа клетки инкубировали с серийными разведениями hT2AB в течение 45-60 мин при комнатной температуре. После удаления супернатанта клетки лизировали M-Per+, содержащим 0,0625 нМ антитела к pSyk (Tyr525/526, 2710, Cell Signaling Technology) и 0,5 нМ биотинилированных антител к Syk мыши, индивидуальный заказ: BD Biosciences) при комнатной температуре в течение 1 часа инкубировали с гранулами 2,5 мкг/мл акцепторного IgG кролика (AL104C, Perkin Elmer) при комнатной температуре в течение 2 часов с последующим добавлением 10 мкг/мл гранул донора стрептавидина (6760002B, Perkin Элмер) при комнатной температуре в течение 2 часов. Указанные концентрации антител и шариков являются окончательными. Сигналы AlphaLISA (количество) измеряли с помощью многофункционального считывателя EnVision.

Измерение уровней sTREM2 и CCL4 в hMac с помощью MSD

[00278] hMac применяли для измерения CCL4 и sTREM2 в кондиционированных средах после обработки антителами контроля изотипа hT2AB или hIgG1. Вкратце, hMac (500000 клеток/лунку/мл) высевали в 6-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C . Среду для выращивания заменяли культуральной средой (RPMI+GlutaMax+1% FBS) на 24 часа, а на следующий день соответствующее количество среды удаляли и заменяли средой, содержащей hT2AB, контрольное антитело изотипа hIgG1 или ацетилированные LDL в конечной концентрации 200 нМ. В определенные моменты времени (4, 8 или 24 часа) среду из каждой обработанной лунки (кондиционированную среду) удаляли и сохраняли для анализа до тех пор, пока не были собраны все образцы. Уровни CCL4 (4, 8 или 24 часа) и sTREM2 (24 часа) измеряли в кондиционированных средах с помощью анализа на основе платформы MSD в соответствии с инструкциями производителя (Meso Scale Discovery)..

Анализ уровня выживания BMM

[00279] BMM от TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} собирали на день 5 культивирования с CSF1 и переносили в 24-луночные плоскодонные планшеты, покрытые hT2AB или контрольным hIgG1, в количестве 5×10^4 клеток/лунку в полной RPMI без CSF1. Уровень выживаемости, измеренный как % популяции клеток, отрицательных в отношении пропидия иодида, определяли через 48 часов культивирования с помощью FACSCalibur.

Репортерный анализ GFP

[00280] Репортерные клетки 2B4 NFAT:GFP, экспрессирующие hTREM2CV и hTREM2R47H, применяли для проверки активации вариантов hTREM2. Вкратце, исходные растворы hT2AB или контрольного hIgG1 разбавляли до указанных

концентраций в карбонатно-бикарбонатном буфере натрия и 50 мкл полученного раствора добавляли в отдельные лунки 96-луночного планшета на ночь. Каждое условие выполняли трижды. Покрытые антителами планшеты трижды промывали холодным PBS перед переносом репортерных клеток 2B4 NFAT:GFP, экспрессирующих hTREM2^{CV} или hTREM2^{R47H}, в соответствующие лунки в концентрации 1000 клеток/мкл. После стимуляции в течение 16 часов клетки переносили в пробирки FACS и считывали на FACSCalibur экспрессию GFP.

Фармакодинамика и фармакокинетика hT2AB

[00281] Группам 10-недельных самцов мышей TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} внутривенно (i.v.) вводили различные дозы hT2AB. Через 48 часов мышей умерщвляли и использовали лизаты головного мозга для измерения концентраций CXCL10, CCL4, CCL2, CXCL2 и CST7 с помощью MSD. В другой группе лечения самцам мышей TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} вводили внутривенно hT2AB в дозе 30 мг/кг. Мышей умерщвляли через 4, 8 и 24 часа после инъекции. Относительные уровни экспрессии генов Cxcl10, Ccl2, Ccl4, Cst7 и Tmem119 измеряли с помощью qRT-PCR. Для фармакокинетического анализа группам 8-месячных мышей TREM2^{CV}, TREM2^{R47H} и Trem2^{-/-} самцов или самок вводили внутрибрюшинно однократную инъекцию 30 мг/кг hT2AB. Концентрации hT2AB в образцах сыворотки крови мыши и в гомогенате мозжечка, перфузированного холодным PBS, измеряли через 48 часов с помощью двух разных анализов. Оба анализа представляли собой сэндвич-иммуноанализы с использованием рекомбинантного TREM2 человека (Amgen, Inc., штат Калифорния) и конъюгированного с рутением моноклонального антитела мыши к Fc человека (Amgen, Inc., штат Калифорния). Нижний предел количественного определения (LLOQ) для анализа гомогената сыворотки крови и мозжечка составлял 100 нг/мл и 1 нг/мл, соответственно.

Анализ одноклеточной РНК-секв.

Вычислительные ресурсы

[00282] Вычислительные ресурсы были легко доступны в Интернете на соответствующих веб-сайтах.

Ресурс	Версия
Cell Ranger	3.0.2
PANTHER	15.0
Python	3.7.4
-umap-learn	0.3.10
Java	1.8.0
-Leiden	1.0.0

Ресурс	Версия
R-статистическое программное обеспечение	3.60
-irlba	2.3.3
-scran	1.14.5
-batchelor	1.2.4
-dbscan	1.1.5
-SingleR	1.0.5
-igraph	1.2.4.2
-caret	6.0.86
-slingshot	1.4.0

-tradeSeq	1.0.1
-----------	-------

Выравнивание ридов

[00283] Эталонный геном был построен путем удлинения мышинового mm10 с помощью TREM2 человека из GRCh38; были использованы аннотации транскриптома из Ensembl 93. Секвенированные риды с микрофлюидной капельной платформы демультимплексировали и выравнивали с использованием CellRanger версии 3.0.2, доступной в 10x Genomics (www.10xgenomics.com), с параметрами по умолчанию. Контроль качества. Авторы настоящего изобретения провели многостадийную оценку качества. Сначала каждый образец анализировали отдельно (фиг. S1A). В настоящем документе все 24 образца прошли первоначальный контроль качества, оценивая распределение всех картированных прочтений по геному и фракцию секвенированных оснований с показателем качества Phred (Q) > 30. Каждый образец включает в себя тысячи захваченных событий, k , которые являются либо настоящими клетками, либо пустыми каплями с окружающей РНК; каждое событие идентифицируется уникальным штрих-кодом b . Для различения отдельных ячеек применяли способ, основанный на обычном пороговом значении общего количества UMI, $\mathbf{u} = (u_b) \in \mathbb{N}^k$.

[00284] Во-первых, каждый штрих-код b , соответствующий $u_b > \sum_{b=1}^k \frac{u_b}{k}$, был ранжирован в порядке убывания общего количества UMI, что привело к вектору $\mathbf{r} = (r_b) \in \mathbb{N}^k$; как правило, $\sum \frac{u_b}{k} \approx 72$ с низкой достоверностью. Для штрих-кодов с одинаковым количеством UMI применяли перестановку с увеличением значений в каждом индексном наборе связей. Затем общее количество UMI было смоделировано как функция ранга штрих-кода, $\ln() \sim \ln()$, путем подгонки кубических гладких сплайнов с 20 степенями свободы. Каждую точку перегиба этой функции можно интерпретировать как переход между подмножеством штрих-кодов с большим количеством общих UMI, то есть каплей, потенциально содержащих клетки, и большинством штрих-кодов с окружающей РНК. Точки перегиба наблюдаются по локальным минимумам первой дифференцировки основных функций сплайна. Для каждого образца была выбрана точка перегиба φ , ближайшая к ожидаемому количеству восстановленных клеток, и были сохранены все штрих-коды, соответствующие $u_b > \varphi$. Выбор φ дополнительно определялся следующими описательными показателями выбранного набора штрих-кодов: i) процент всех ридов, отнесенных к выбранным штрих-кодам, ii) среднее количество ридов на штрих-код, iii) медианная фракция ридов, сопоставленных с митохондриальными генами на штрих-код, iv) среднее количество UMI на штрих-код, v) среднее количество генов с по меньшей мере

одним счетчиком UMI на штрих-код и vi) медианная фракция ридов, происходящих из уже наблюдаемого UMI (насыщение). Выбор клеток был дополнительно уточнен путем оценки распределений показателей ii-vi) для удаления клеток и дублетов низкого качества. Наконец, авторы настоящего изобретения оценили эффект клеточного цикла в каждом образце. Фаза клеточного цикла на клетку была предсказана с использованием подхода, основанного на машинном обучении, предложенного Scialdone et al. (1). Вкратце, классификатор был обучен на парах генов, которые меняют направленность экспрессии на разных фазах клеточного цикла. Затем состояние клеточного цикла каждой клетки можно спрогнозировать, изучив знак различия экспрессии в новом наборе данных. Клетки с прогнозируемым показателем G1 или G2M выше 0,5 были отнесены к фазам G1 или G2M, соответственно; клетки классифицировали как находящиеся в S-фазе, если прогнозируемые показатели G1 и G2M были ниже 0,5. Все расчеты проводили с использованием функции циклона в скране пакета R. Предсказанные оценки и фазы клеточного цикла не применяли для фильтрации клеток.

[00285] Затем был проведен интегративный этап контроля качества для выявления нежелательных технических артефактов в данных. Все отфильтрованные 94488 клеток из всех образцов были объединены, и результирующая матрица подсчета UMI была нормализована и логарифмически преобразована (см. раздел «Нормализация»). Чтобы выявить технические артефакты в данных, были рассчитаны основные компоненты, которые фиксируют максимальную дисперсию в данных при контроле явных переменных пола, возраста и лечения. С этой целью переменные манифеста были частично исключены из матрицы нормализованного подсчета UMI. Информативные гены были беспристрастно определены по их средней зависимой от экспрессии дисперсии в данных (см. раздел «Моделирование дисперсии экспрессии генов») и применяли для расчета главных компонентов скорректированной матрицы подсчета UMI (см. раздел «Уменьшение спектральной размерности»). Полученное 38-мерное скрытое пространство было дополнительно смоделировано с помощью нечеткой топологической структуры с использованием унифицированного многообразия аппроксимации и проекции (UMAP; пакет Python umap-learn) (2) для раскрытия структуры данных, которая определяется либо типом клетки, либо техническими различиями. В то время как разные размеры библиотек могут быть нормализованы между ячейками, большая часть пропущенных значений (т. е. выпадений) из-за плохого охвата транскриптома не может быть точно восстановлена в данных и значительно повлияет на последующие анализы. Таким образом, для оценки качества клеток был рассчитан первый главный компонент набора из семи показателей качества, оценивающих покрытие транскриптомом на клетку: i-iv) фракция ридов,

потребляемых наиболее экспрессируемыми {500, 200, 100, 50} генами, v_i) фракция митохондриальных ридов, v_i) относительное расстояние до максимального общего количества UMI (т. е., $1 - \frac{u_b}{\max(u)}$), v_{ii}) относительное расстояние до максимального количества генов по меньшей мере с одним подсчетом UMI. Полученная оценка качества клеток (CQ) была затем наложена на UMAP, выявляя техническую помеху в данных (фиг. S1B). Используя пространственную кластеризацию на основе плотности (R-пакет `dbscan`), авторы настоящего изобретения выделяли репрезентативную группу ячеек с низким показателем CQ. Авторы настоящего изобретения определяли оптимальное пороговое значение показателя CQ, равное -0,1, которое удаляет максимальную фракцию клеток в этой группе (91,4%) и минимальную фракцию клеток в другой группе (11,1%), определяя колесо обратной эмпирической функции распределения кумулятивного показателя CQ (фиг. S1C). В результате был получен окончательный набор данных из 71303 высококачественных одиночных клеток (фиг. S1D).

Нормализация

[00286] Размеры библиотек были нормализованы, как было предложено Lun et al. (3). Вкратце, факторы размера вычисляли из пулов похожих клеток, которые затем деконволютировали в факторы на основе клеток и применяли для масштабирования подсчетов в каждой ячейке. Во-первых, для каждой партии коэффициенты масштабирования для каждой ячейки были рассчитаны с помощью R-пакета. Первоначальное предположение о популяциях клеток, содержащихся в данных, было рассчитано с использованием функции `quickCluster` на общем графике ближайших соседей; авторам настоящего изобретения требовался минимальный размер кластера φ , равный 10% от общего числа ячеек, и минимальное среднее значение экспрессии гена, равное 1, для построения общего графика ближайших соседей. Затем были рассчитаны коэффициенты размера с использованием функции `computeSumFactors` с размерами пула в диапазоне $[21, \max\{101, \varphi+1\}] \in \mathbb{N}$. Затем коэффициенты масштабирования нормализовали между партиями на основе их соотношения среднего количества UMI, чтобы обеспечить сопоставимые результаты с партиями с наименьшим покрытием с использованием R-пакета `batchelor`. Наконец, масштабированная матрица подсчета UMI \mathbf{X} была преобразована в \log_2 с помощью $\log_2(\mathbf{X}+1)$.

Аннотация типа контролируемых CD45+ клеток

[00287] Вместо того, чтобы определять идентичность клеток путем предвзятого выбора маркерных генов, типы клеток были смещенно охарактеризованы с использованием всего доступного транскриптома. Для этой цели сначала отфильтровывали сильно экспрессированные гены с более чем 4 молекулами по меньшей мере в 50 клетках, удаляли рибосомные и митохондриальные гены (полученные из Gene Ontology GO:0005840 и Ensembl, соответственно), оставляли только белок-кодирующие

гены, а набор из 136 генов, сильно коррелирующих с ответом на стресс, вызванный диссоциацией (4), был удален. Это привело к матрице выражения с одной клеткой \mathbf{X} , состоящей из n векторов данных \mathbf{x}_j с $j \in 1, \dots, 71303$ размерности $m=4453$: $\mathbf{X}=(x_{ij}) \in \mathbb{R}^{4453 \times 71303}$. Применяли логарифмически нормализованные данные экспрессии генов микрочипов 20 типов иммунных клеток, измеренные в 830 чистых образцах отсортированных клеток в рамках Immunological Genome Project (ImmGen) (5); обработанная матрица выражений $\mathbf{X}=(x_{ij}) \in \mathbb{R}^{4453 \times 71303}$ была получена из R-пакета SingleR. Было отфильтровано 3697 генов, которые сильно различались в этом наборе данных, путем оценки средней дисперсии, зависящей от экспрессии (см. раздел «Моделирование дисперсии экспрессии генов»). Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена, $\rho(x_i, y_j)$, были рассчитаны между всеми отдельными ячейками, $x_i \in \mathbb{R}^{992}$, и всеми образцами ImmGen, $y_j \in \mathbb{R}^{992}$, с использованием 992 генов, перекрывающихся между обоими наборами данных. Каждой отдельной клетке был присвоен тип клетки с наиболее похожим профилем экспрессии с помощью $\arg \max_j \rho(x_i, y_j)$. На этой стадии в наборе данных было обнаружено 15 типов клеток. Поскольку исходное пространство экспрессии данных по отдельным клеткам изобилует шумом, а лежащие в основе распределения количества scRNA-seq UMI и интенсивности сигналов микрочипов различаются, авторы настоящего изобретения стремились уточнить первоначальную классификацию типов клеток. Для этой цели явные переменные пол, возраст и лечение, а также три технических фактора (фракция ридов, сопоставленных с митохондриальными генами, общее количество ридов, фракция ридов, связанных с генами ответа на стресс, связанной с диссоциацией) были подвергнуты регрессии из \mathbf{X} . Затем было рассчитано 39-мерное пространство главных компонент (см. раздел «Уменьшение спектральной размерности») для сильно изменчивых генов (см. раздел «Моделирование дисперсии экспрессии генов») и подвергнуто UMAP (пакет Python umap-learn) для развертывания структуры данных, управляемой клеточной идентичностью. Затем авторы настоящего изобретения создали взвешенную матрицу смежности клеток; значения веса рассчитывали по индексу Жаккара между клетками с использованием перекрытия их 15 ближайших окрестностей. Авторы настоящего изобретения идентифицировали 30 клеточных сообществ (сегментов) в матрице смежности, используя алгоритм Лейдена (6) (Java-пакет Leiden) с разрешением 3×10^{-4} . Затем данные были сведены в таблицу путем подсчета для каждого сегмента i количества клеток с типом клетки j , в результате чего была получена матрица $\mathbf{A}=(a_{ij}) \in \mathbb{N}^{30 \times 15}$. Чтобы избежать деления на 0 в последующих вычислениях, был добавлен псевдосчетчик $\mathbf{A}=\mathbf{A}+1$. Матрица показателя обогащения $\mathbf{A}'=(a'_{ij}) \in \mathbb{R}^{30 \times 15}$ была получена.

$$a'_{ij} = \ln \left(\frac{a_{ij}}{\sum_{j=1}^{15} a_{ij} - a_{ij}} \right) - \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^{30} a_{ij} - a_{ij}}{\sum_{i=1}^{30} \sum_{j=1}^{15} a_{ij} - \sum_{j=1}^{15} a_{ij} - \sum_{i=1}^{30} a_{ij} + a_{ij}} \right)$$

Наконец, каждой клетке в каждом сегменте был присвоен тип клетки с наивысшей показателем обогащения. Это выявило 64274 клетки микроглии в наборе данных.

Дифференциальный анализ экспрессии генов

[00288] Чтобы идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены между двумя группами клеток, авторы настоящего изобретения разработали интуитивно понятный и масштабируемый подход, основанный на байесовской статистике. В настоящем документе авторы настоящего изобретения рассчитали специфичность и частоту обнаружения для каждого гена в каждой группе. Авторы настоящего изобретения определили специфичность апостериорной вероятностью $P(j=Z \mid x_{ij} > \varphi)$. Данное определяет вероятность того, что клетка j является представителем группы Z , если признак i наблюдался более выраженным, чем пороговое значение φ . Уровень обнаружения определяли с помощью апостериорной вероятности $P(x_{ij} > \varphi \mid j=Z)$, т. е. относительной фракцией клеток, экспрессирующих ген i выше порога φ в группе Z . Параметр порога φ был установлен равным 2 (т. е. по меньшей мере 4 молекулы на клетку). Все условные вероятности были рассчитаны с использованием теоремы Байеса со скорректированными предельными вероятностями, чтобы избежать систематической ошибки размера выборки:

$$P(j = Z) = 0.5$$

$$P(x_{ij} > \varphi) = \frac{P(x_{ij} > \varphi \mid j = Z)\lambda + P(x_{ij} > \varphi \mid j \neq Z)\lambda}{2\lambda}$$

где λ представляет собой максимальную мощность обеих групп. Кроме того, абсолютные различия между средними значениями интенсивности экспрессии гена i оценивали с использованием величины эффекта, определяемой коэффициентом Коэна d :

$$d(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma_{1,2}}$$

где μ представляет собой среднее значение экспрессии гена, и $\sigma_{1,2}$ представляет собой объединенное стандартное отклонение двух образцов $\{1,2\}$:

$$\sigma_{1,2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

σ^2 представляет собой дисперсию экспрессии гена в одной группе.

Аннотация исходного уровня микроглии

[00289] Для последующего анализа авторы настоящего изобретения отфильтровывали нормализованную и обработанную матрицы экспрессии генов \mathbf{X} по устойчиво экспрессируемым генам с более чем 2 молекулами в по меньшей мере 50 клетках, удалили рибосомные и митохондриальные гены (полученные из Gene Ontology GO:0005840 и Ensembl, соответственно), сохраняли только гены, кодирующие белок, и удалили набор генов, сильно коррелирующих со стрессовым ответом, вызванной диссоциацией (4). Чтобы аннотировать исходную гетерогенность клеток микроглии, авторы настоящего изобретения выделили 5694 клетки от контрольных самцов и самок

мышей TREM2^{CV}-5XFAD, получавших hIgG1. В результате была получена отфильтрованная матрица выражения с одной ячейкой $X'=(x'_{ij}) \in \mathbb{R}^{11361 \times 5694}$. Векторы данных высоковариабельных генов (см. раздел «Моделирование дисперсии экспрессии генов») были встроены проксимально к нелинейному многообразию более низкой размерности с использованием диффузионных карт (см. раздел «Уменьшение спектральной размерности»). Это выявило временную ось в данных, предположительно траекторию активации микроглии. Взвешенная матрица смежности ячеек была рассчитана из компонентов диффузии с использованием индекса Жаккарда перекрытия ближайших окрестностей каждой ячейки. Полученный график был кластеризован с применением способа обнаружения сообществ Лувена, доступного в R-пакете `igraph`. Чтобы лучше понять лежащую в основе временную топологию данных, авторы настоящего изобретения устанавливали неограниченное дерево максимальной экономии между всеми 11 кластерами, используя функцию `getLinages` из R-пакета `slingshot`. С его помощью выявляли разветвленную траекторию с 5 терминальными концами. Кластер с самой высокой экспрессией общего маркера микроглии был определен как покоящаяся популяция микроглии. Далее авторы настоящего изобретения сравнивали полученные кластеры с эталонным профилем выражения DAM из предыдущего исследования (7). Во-первых, авторы настоящего изобретения рассчитывали векторы с \log_2 -кратными изменениями экспрессии генов между всеми кластерами и популяцией покоящейся микроглии в полученных данных. Затем авторы настоящего изобретения вычисляли единый вектор \log_2 -кратных изменений между DAM стадии 2 и популяцией в состоянии покоя в эталонном исследовании. В целом 10124 гена перекрывались между обоими исследованиями, получая вектор \log_2 -кратности изменения $z_i \in \mathbb{R}^{10124}$ для каждого кластера и эталона. Только гены с абсолютным \log_2 -кратным изменением $> 0,5$ считали дифференциально выраженными, и их сохраняли для последующего анализа. Каждый вектор \log_2 -кратного изменения был бинаризован с использованием знака сигнум-функции(z_i). Авторы настоящего изобретения сводили данные в таблицу, подсчитав совпадения и разногласия в направленности выражений между полученными данными и справочным исследованием, что привело к таблице сопряженности $A=(a_{ij}) \in \mathbb{N}^{2 \times 2}$. Авторы настоящего изобретения интерпретировали эту таблицу как матрицу путаницы, т. е. насколько хорошо полученные данные предсказывают тенденцию выражения эталонной популяции DAM. В настоящем документе авторы настоящего изобретения рассчитали показатель сходства, вычитая сумму недиагональных значений (ложноположительные+ложноотрицательные) из трассировки матрицы (истинно положительные+истинные отрицательные значения). Далее авторы настоящего изобретения проверили нулевую гипотезу о том, что общее соответствие между обоими наборами данных, определенными трассировкой (A)/ $\sum_i \sum_j a_{ij}$ меньше или равно частоте отсутствия информации, определяемой фракцией самого большого класса в данных; статистику тестов рассчитывали с помощью символа вставки R-пакета.

[00290] Предсказанные фазы клеточного цикла каждой клетки использовали для

идентификации группы циклирующих клеток микроглии; предсказание фазы клеточного цикла и оценку выполняли на этапе контроля качества (см. раздел «Контроль качества»). Анализы обогащения терминов Gene Ontology проводили с использованием системы классификации PANTHER (8) для функциональной характеристики профиля выражения выбранных кластеров. Маркерные гены определяли путем сравнения одного кластера с клеточным пулом всех других кластеров (см. раздел «Дифференциальный анализ экспрессии генов»); гены выбирали в соответствии с минимальными пороговыми значениями специфичности/частоты обнаружения/величины эффекта (IFN-R: 75,0%/10,0%/1,5, MHC-II: 50,0%/10,0%/1,0). Авторы настоящего изобретения использовали 11361 ген, содержащийся в полученном наборе данных, в качестве справочного списка для каждого статистического теста сверхпредставленности. Частоту ложных открытий применяли для корректировки точных Р-значений критерия Фишера для множественного тестирования.

Гармонизация образцов

[00291] Учитывая, что инъекции hT2AB и контрольного hIgG1 выполняли мышам разного пола и носителям различных вариантов TREM2, авторы настоящего изобретения затем разрабатывали подход к гармонизации образцов под наблюдением, чтобы определить влияние пола, генотипа и лечения на четыре траектории микроглии (фиг. S3A). Авторы настоящего изобретения использовали полученные результаты исходного анализа микроглии контрольных мышей, получавших hIgG1, в качестве эталона для классификации клеток образцов из различных условий. Чтобы свести к минимуму ошибки классификации, рассчитывали диффузионные компоненты эталонного набора данных и каждого набора данных запроса (см. Раздел «Уменьшение спектральной размерности»). Машинное обучение было применено к низкоразмерному многообразию для изучения типов ячеек из эталонного набора и для классификации набора данных запроса с использованием повышения градиента Xtreme. Гиперпараметры модели машинного обучения оптимизировали с помощью поиска по сетке, предоставляемого R-пакетом Caret. Поскольку многообразие описывает континуум развития с перекрывающимися границами кластеров клеток, авторы настоящего изобретения принимали разумную среднюю точность обучения 87,5%, чтобы избежать переобучения. Для оценки общей точности классификации авторы настоящего изобретения использовали обратную проекцию. Авторы настоящего изобретения обучали классификатор предсказанным классам набора данных запроса и проецировали типы ячеек для эталонного набора данных. Средняя точность обучения, равная 92,9%, указывает на то, что предсказанные классы набора данных запроса обладают высокой степенью согласованности. Полученная модель достигла высокой общей средней точности прогноза 86,3% (фиг. S3B).

Реконструкция траектории типа клеток микроглии

[00292] Чтобы проанализировать отдельные траектории для каждого типа клеток микроглии, авторы настоящего изобретения извлекали кластер ветвления, все терминальные кластеры и промежуточный кластер t6 из матрицы выражения, содержащей

все образцы. Затем данные разделяли по типу клеток. Траектория DAM={t5, t6, DAM}, траектория Сус-М={t5, Сус-М}, траектория IFN-R={t5, IFN-R}, траектория МНС-II={t5, МНС-II}. Клетки каждой траектории типа клеток встраивали в многообразие более низкого измерения с использованием карт диффузии (см. раздел «Уменьшение спектральной размерности») на генах с наивысшей вариабельностью (см. раздел «Моделирование дисперсии экспрессии генов») и проецировали на 2 измерения с помощью UMAP, чтобы развернуть скрытую временную ось. Чтобы еще больше упорядочить клетки в хронологическом порядке, авторы настоящего изобретения подбирали гладкие кривые траектории для каждой линии, используя основные кривые и спроецированные точки данных ортогонально, используя рогатку R-пакета; в настоящем документе длины дуг интерпретировали как значения псевдовремени (9).

Анализ состава типа клеток

[00293] Авторы настоящего изобретения стремились определить различия в пропорциях типов клеток микроглии в зависимости от пола, генотипа и лечения. Фракции типов клеток в данных по отдельным клеткам не соответствуют линейно истинным пропорциям *in vivo* из-за технических артефактов, в том числе, среди прочего, повреждения клеток, вызванного подготовкой и обработкой образцов или изменениями давления во время сортировки клеток. Кроме того, небольшие размеры выборки могут неадекватно отражать реальную совокупность. Это может вызвать большие различия в пропорциях типов клеток между биологическими повторами. Используя стратифицированную бутстрепную повторную выборку, авторы настоящего изобретения могут оценить среднее значение генеральной совокупности и скорректировать систематическую ошибку выборки отдельных повторов, а также измерить неопределенность оценки. Пусть $\mathbf{W}=(w_{ij}) \in \mathbb{N}^{m \times 2}$ - матрица меток, состоящая из 2-мерных векторов с индикатором метки (например, типом клетки или временным интервалом) и индикатором биологической репликации для m клеток, l уровней метки и d биологических повторов. Например, $\mathbf{w}_1=\{10, 2\}$ - вектор метки для первой клетки, указанной в \mathbf{W} , которая была отобрана с временного интервала 10 и из второго биологического повтора. Авторы настоящего изобретения построили стратифицированные повторные выборки размером k , где k был установлен на максимальный размер повтора. Затем каждая повторная выборка была сведена в таблицу, в результате чего была получена матрица $\mathbf{V}=(v_{ij}) \in \mathbb{R}^{d, l}$, которая содержала абсолютное количество клеток на метку клетки и повторение. Чтобы консервативно скорректировать систематические ошибки в одиночных повторностях, повторные выборки были объединены.

$$\mathbf{b} = \frac{\min_i v_{ij}}{k}, j = 1, \dots, l$$

Результирующий вектор $\mathbf{b} \in \mathbb{R}^l$ представлял собой выборку пропорций типов клеток. Авторы настоящего изобретения выполняли $N=500$ итераций начальной загрузки, в результате чего была получена матрица $\mathbf{B}=(b_{ij}) \in \mathbb{R}^{N \times l}$. Оценки соотношения типов

клеток $\mu \in \mathbb{R}^l$ получали по формуле

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N b_{ij}}{N}, j = 1, \dots, l$$

Стандартную ошибку для 95% доверительного интервала для установленной доли типа клеток метки j получали следующим образом:

$$SE_j = 1.96 \frac{\sigma_j}{\sqrt{N}} \text{ with } \sigma_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N b_{ij} - \mu_j}{N - 1}}$$

Вывод динамики экспрессии

[00294] Авторы настоящего изобретения подгоняли экспрессию генов как функцию псевдовремени для траектории каждого типа клеток микроглии на подмножестве клеток определенного генотипа, пола и лечения, используя отрицательные биномиальные обобщенные аддитивные модели (NB-GAM) (10). Были проведены тесты Вальда для проверки гипотезы о том, отличаются ли начало или конец динамической кривой гена в зависимости от условий, и соответствующие логарифмические кратные изменения были рассчитаны с использованием параметров сглаживателей NB-GAM. Эти расчеты были выполнены с помощью R-пакета `tradeSeq`. Чтобы статистически классифицировать динамику генов, P-значения теста Вальда корректировали для множественного тестирования с помощью частоты ложных открытий. Каждое скорректированное P-значение p взвешивали по знаку логарифмической кратности изменения S на p^S и преобразовывали $-\log_{10}$. Полученные отрицательные значения обозначали отрицательную регуляцию, а положительные значения указывали на повышающую регуляцию, соответственно.

Моделирование дисперсии экспрессии генов

[00295] Предполагая, что биологическая гетерогенность обусловлена подмножеством генов, имеющих высокую изменчивость между клетками, авторы настоящего изобретения стремились улучшить разрешение, удаляя гены, управляемые техническим шумом. Общую дисперсию каждого гена разлагают на его биологические и технические компоненты путем подгонки дисперсии как функции средней экспрессии (11). Значимость выводят путем моделирования остатков этой подгонки с помощью F-распределения. Чтобы сохранить изменчивость, специфичную для состояния, всегда применяют объединение всех сильно изменчивых генов всех партий. Декомпозицию дисперсии и статистику F-распределения рассчитывали с использованием R-пакета `scan`.

Снижение спектральной размерности

[00296] Этот шаг направлен на уменьшение избыточности и улучшение отношения сигнал-шум в данных, что в конечном итоге выявит скрытые биологические факторы в данных. Для этого применяли способы уменьшения спектральной размерности. Линейное спектральное вложение получают с помощью анализа основных компонентов (PCA).

Данный способ фиксирует максимальную дисперсию данных. Он может пропускать подструктуры в данных, но его достаточно для данных с низкой внутренней сложностью или его можно применять для получения первого представления о структуре данных. PCA рассчитывали с помощью R-пакета *irlba*. Нелинейное встраивание было выполнено с использованием диффузионных карт (12). Данный способ разрешает нелинейные и линейные подструктуры в данных на основе матрицы несходства клеток, рассчитанной на основе функции расстояния D в профиле экспрессии каждой клетки. Однако вместо расчета компонентов диффузии с использованием предполагаемой глобальной сигмы в ядре диффузии K с $K(x_i, x_j) = \exp\left(\frac{-D(x_i, x_j)^2}{2\sigma}\right)$, применяли множественные локальные сигмы, как было предложено Naghverdi et al. (13):

$$K(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \sqrt{\frac{2\sigma_i\sigma_j}{\sigma_i^2 + \sigma_j^2}} \exp\left(\frac{-D(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j)^2}{\sigma_i^2 + \sigma_j^2}\right)$$

[00297] Авторы настоящего изобретения учитывали пакетные эффекты в данных следующим образом. В отношении PCA авторы настоящего изобретения центрировали матрицу входного выражения по среднему значению центральных векторов каждой партии и масштабировали ковариационную матрицу по общему количеству клеток каждой партии. Это гарантирует, что каждая партия в равной степени способствует идентификации векторов нагрузки (т. е. в PCA не будут доминировать образцы с большим количеством клеток). Для диффузионных карт авторы настоящего изобретения применяли надежное попарное косинусное корреляционное расстояние. Для обоих способов результирующая матрица меньшей размерности была скорректирована с учетом пакетных эффектов с применением пакетной коррекции для ближайших соседей (14) (R-пакет *batchelor*). Количество выбранных компонентов определяли с помощью анализа экранного графика.

Иммуноокрашивание для A β и анализ изображений

[00298] Свободно плавающие срезы головного мозга первоначально блокировали и пермеабелизировали раствором PBS+3% BSA, содержащим 0,25% Triton X-100. Первичные антитела добавляли в разведении 1:1000 для A β 1-16 (6E10, конъюгированное Alexa Fluor 488, 803013, BioLegend) и 1:500 для A β 42 (кроличьи рекомбинантные моноклональные, Thermo Fisher Scientific) при 4°C в течение ночи. Вторичные антитела, антитело к IgG кролика Alexa Fluor 647 (козье рекомбинантное поликлональное, 1:1000; Invitrogen) и метокси-X04 (3 мкг/мл; Tocris) добавляли в течение 1,5 часа при комнатной температуре. Конфокальные изображения получали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon A1Rsi+ с использованием объектива 20 × 0,95-NA. Были записаны z-стеки с шагом 1,1 мкм в направлении z, разрешением 1024 × 1024 пикселей.

Процент покрытия области A β был рассчитан автоматически путем пакетной обработки в ImageJ.

Количественное определение A β и хемокинов/цитокинов

[00299] A β ₁₋₄₀ и A β ₁₋₄₂ человека измеряли с помощью набора MSD V-plex 6E10 (Meso Scale Discovery), а мышинные IL-1b, CXCL10 (IP-10) и CCL4 (MIP-1b) измеряли с помощью анализа с U-plex biomarker group 1 от MSD (Meso Scale Discovery). Вкратце, ткани коры головного мозга мышей, обработанных антителом или контрольным hIgG1, гомогенизировали с помощью Tissue Lyser II (Qiagen) в 12х об/вес PBS, содержащем 0,5% Triton x-100 и 1х смесь ингибиторов протеазы Halt. Нерастворимую фракцию осаждали ультрацентрифугированием при 100000g в течение 1 часа. Супернатант собирали в виде растворимой в PBS фракции. Осадок ресуспендировали в 250 мкл буфера, 6 М гуанидина и 50 мМ Трис, pH 8,0 и дополнительно гомогенизировали с помощью обработки ультразвуком с последующим ультрацентрифугированием при 75000 об./мин с осветлением денатурированного осадка. Супернатант собирали в виде нерастворимой фракции гуанидина.

7.1.9. Дополнительные ссылки

[00300] Конкретные ссылки, приведенные ниже и обсуждаемые в настоящем документе, включены в полном объеме.

1. A. Scialdone, et al., Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods* 85, 54-61 (2015).
2. E. Becht, et al., Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat. Biotechnol* 37, 38-47 (2019).
3. A. T. L. Lun, K. Bach, J. C. Marioni, Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts. *Genome BioL* 17, 1-14 (2016).
4. S. C. Van Den Brink, et al., Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat. Methods* 14, 935-936 (2017).
5. T. S. P. Heng, et al., The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunot* 9, 1091-1094 (2008).
6. V. A. Traag, L. Waltman, N. J. van Eck, From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Bd. Rep.* 9, 1-12 (2019).
7. H. Keren-Shaul, et al., A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17 (2017).
8. H. Mi, et al., Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat. Protoc.* 14, 703-721 (2019).
9. K. Street, et al., Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 477 (2018).
10. K. Van den Berge, et al., Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. *Nat. Commun.* 11, 1-13 (2020).
11. A. T. L. Lun, D. J. Mccarthy, J. C. Marioni, A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor [version 2 ; referees : 3 approved , 2

approved with reservations]. F1000Research (2016).

12. R. R. Coifman, S. Lafon, Diffusion maps. *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 21, 5-30 (2006).

13. L. Haghverdi, F. Buettner, F. J. Theis, Diffusion maps for high-dimensional single-cell analysis of differentiation data. *Bioinformatics* 31, 2989-2998 (2015).

14. L. Haghverdi, A. T. L. Lun, M. D. Morgan, J. C. Marioni, Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat. Biotechnol.* 36, 421-427 (2018).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации пациента с болезнью Альцгеймера, который получит пользу от лечения агонистом TREM2, включающий

получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 и USP18;

введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

получение второго биологического образца от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 и USP18.

2. Способ прогнозирования ответа на агонист TREM2 при лечении болезни Альцгеймера у пациента, включающий следующие стадии:

получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

обработка биологического образца от пациента или эталонного образца;

измерение в обработанном биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-

AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

сравнение одного или более биомаркеров в биологическом образце до обработки с одним или более биомаркерами в обработанном биологическом образце или обработанном эталонном образце и

необязательно продолжение введения пациенту агониста TREM2, если прогнозируется, что такое введение будет иметь эквивалентную или более высокую вероятность успеха по сравнению с альтернативным способом лечения болезни Альцгеймера;

при этом изменение уровня биомаркера в ответ на стадию (с) является прогностическим фактором вероятности успешного лечения болезни Альцгеймера на основании большего или меньшего изменения уровня биомаркера по сравнению с одним или более схожими пациентами и по оценке с помощью уровня одного или более биомаркеров.

3. Способ лечения болезни Альцгеймера агонистом TREM2, включающий

получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

измерение в первом биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

получение второго биологического образца после введения пациенту агониста TREM2 и

измерение во втором биологическом образце уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

где если уровень одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5,

BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18, во втором биологическом образце от пациента выше, чем в первом биологическом образце от пациента, то пациенту вводят одну или более дополнительных доз агониста TREM2.

4. Способ мониторинга ответа пациента на агонист TREM2, включающий следующие стадии:

получение первого биологического образца от пациента до введения пациенту агониста TREM2;

измерение в первом биологическом образце от пациента уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

введение пациенту эффективного количества агониста TREM2;

получение одного или более последующих биологических образцов от пациента после введения пациенту агониста TREM2 и

измерение в последующем(их) биологическом(их) образце(ах) уровня одного или более биомаркеров, выбранных из APOE, B2M, BIRC5, BST2, C1QA/B/C, CCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCNB2, CD3G, CD63, CD74, CD81, CD9, CST7, CTSB, CXCL10, CXCL2, FTL1, H2-AA, H2-AB1, H2AFV, H2AFZ, H2-D1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-K1, H2-OA, H2-OB, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, HEXB, HMGB2, HMGN2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IL1B, IRF7, ISG15, LGALS3BP, LGMN, LPL, LY6E, MLF, MR1, MRC1, MS4A4B, OASL2, OLFML3, P2RY12, PF4, RTP4, SLFN2, SPARC, STMN1, TMEM119, TUBA1B, TUBB5 или USP18;

при этом уровни одного или более биомаркеров в первом биологическом образце и последующих биологических образцах поддаются сравнению, и изменения в уровне одного или более биомаркеров указывают на степень ответа пациента.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из FTL1, MLF, CD63, LPL, CTSB, CST7, APOE, CCL4, CD9 или CCL3.

6. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из C1QA/B/C, CD81, HEXB, IL1B, LGMN, OLFML3, P2RY12, SPARC, TMEM119, MRC1, PF4, CD3G или MS4A4B.

7. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из

H2AFZ, HMGB2, TUBA1B, HMGN2, H2AFV, IFI2712A, TUBB5, BIRC5, STMN1 или CCNB2.

8. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из CCL12, IFITM3, ISG15, IFIT3, BST2, OASL2, LGALS3BP, RTP4, IFI204 или IRF7.

9. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из H2-K1, H2-Q7, H2-EB1, CD74, H2-AA, H2-D1, H2-AB1, H2-DMA, H2-T23 или LY6E.

10. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из BST2, CCL2, IFI204, IFI2712A, IFIT3, IFITM3, IRF7, ISG15, LGALS3BP, OASL2, RTP4, SLFN2 или USP18.

11. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из B2M, H2-D1, H2-K1, H2-Q10, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, MR1, CD74, H2-AA, H2-AB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-DMB2, H2-EB1, H2-OA или H2-OB.

12. Способ по любому из пп. 1-4, где один или более биомаркеров выбраны из CCL2, CCL4, CST7, CXCL2, CXCL10, IL1B или TMEM119.

13. Способ индуцирования активации микроглии у пациента в направлении определенных траекторий типов клеток микроглии, включающий введение пациенту эффективного количества агониста TREM2, при этом активация микроглии у пациента направлена на

траекторию типа ассоциированной с заболеванием (DAM) микроглии;

траекторию типа чувствительной к интерферону (IFN-R) микроглии;

траекторию типа циклирующей (Сус-М) микроглии и/или

траекторию типа микроглии, экспрессирующей МНС-II (МНС-II),

при этом у пациента диагностирована болезнь Альцгеймера.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где агонист TREM2 представляет собой антитело к hTREM2.

15. Способ по п. 14, где антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:6; CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:7; и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:10; CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:11; и CDRH3 имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:12.

16. Способ по п. 14, где антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где антитело к hTREM2 представляет собой IgG, необязательно IgG₁.

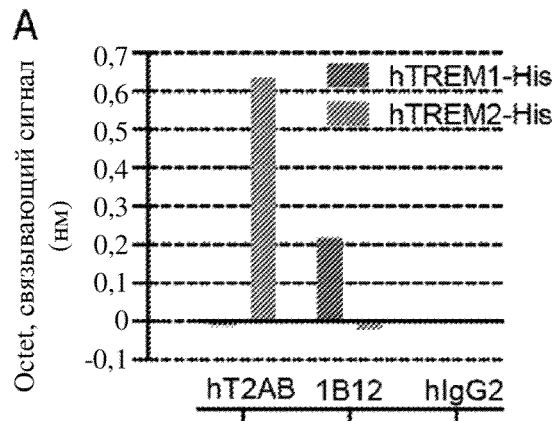
18. Способ по любому из пп. 15-17, где антитело к hTREM2 содержит константную

область легкой каппа-цепи.

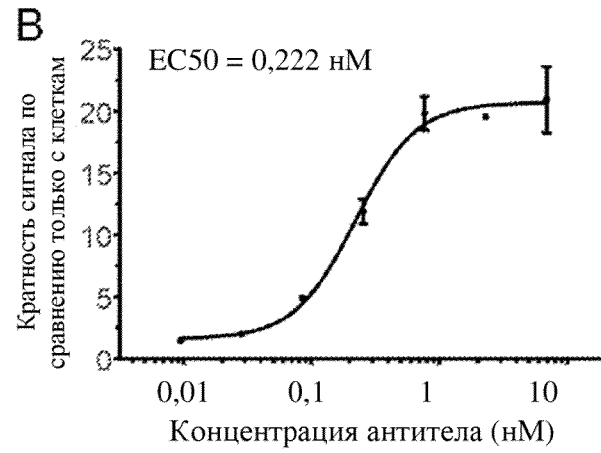
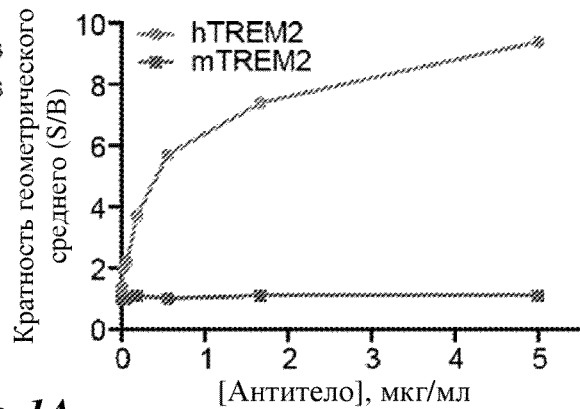
19. Способ по любому из пп. 15-18, где антитело к hTREM2 представляет собой IgG₁, содержащий вариантную константную область, предусматривающую одну или более мутаций, выбранных из R292C, N297G, V302C, D356E или L358M, в соответствии с нумерацией EU.

20. Способ по любому из пп. 15-19, где антитело к hTREM2 содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16.

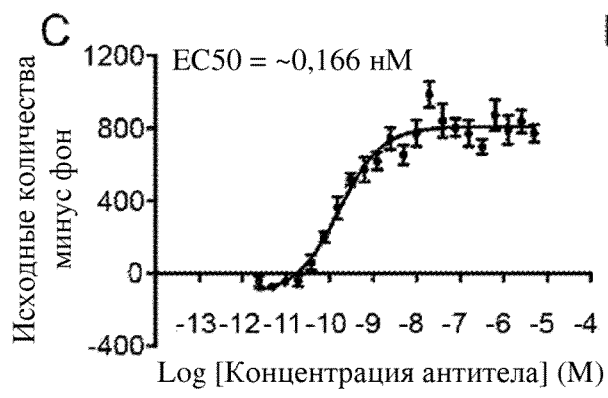
По доверенности



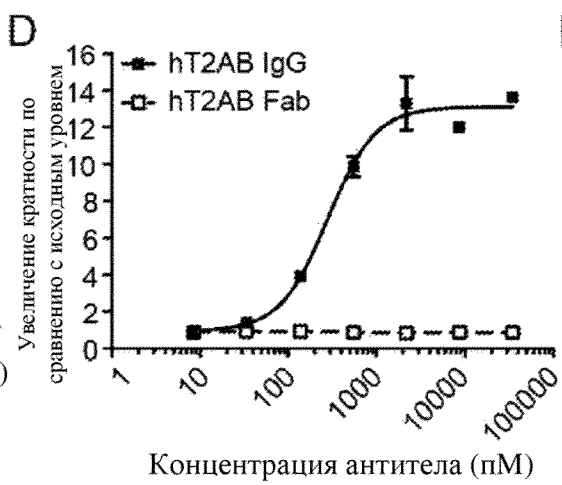
Фиг. 1А



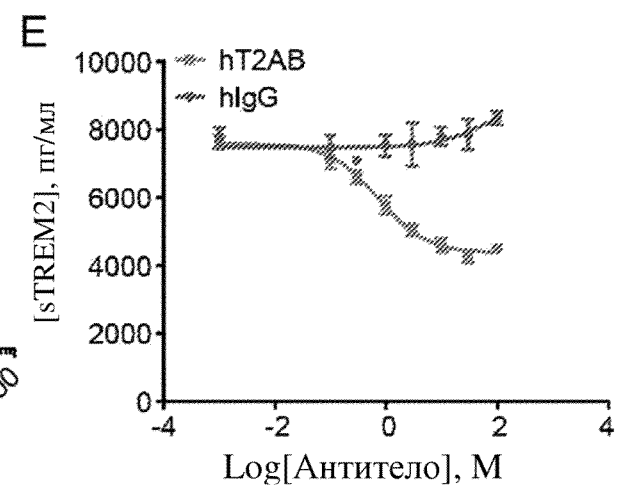
Фиг. 1В



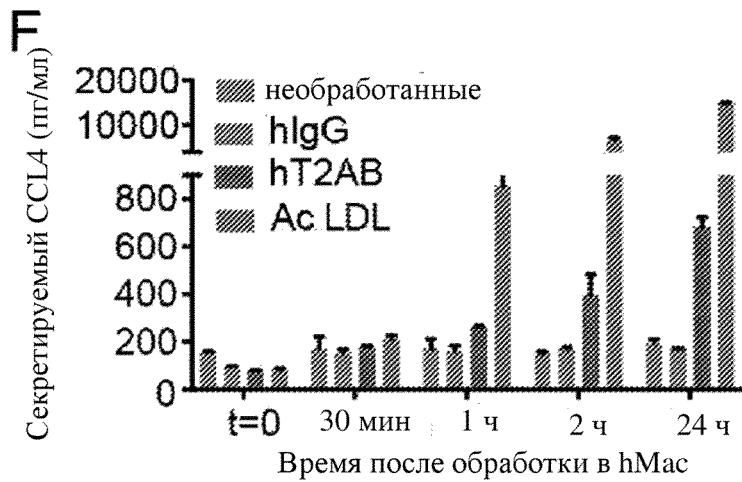
Фиг. 1С



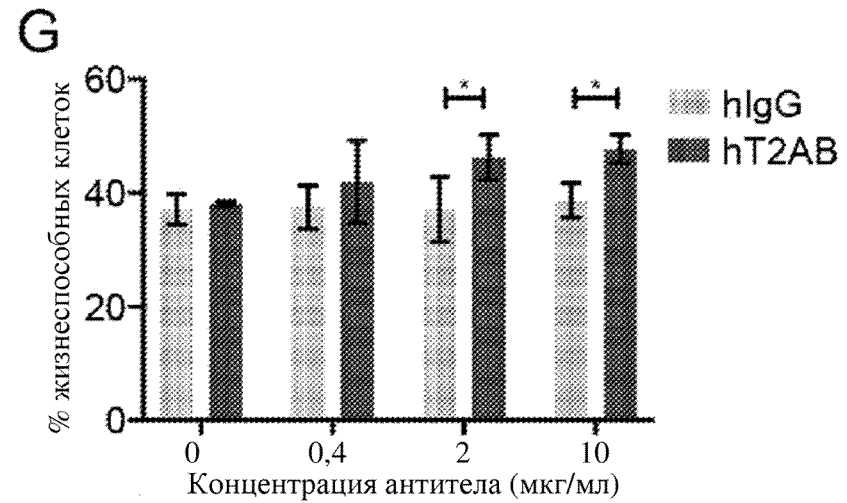
Фиг. 1D



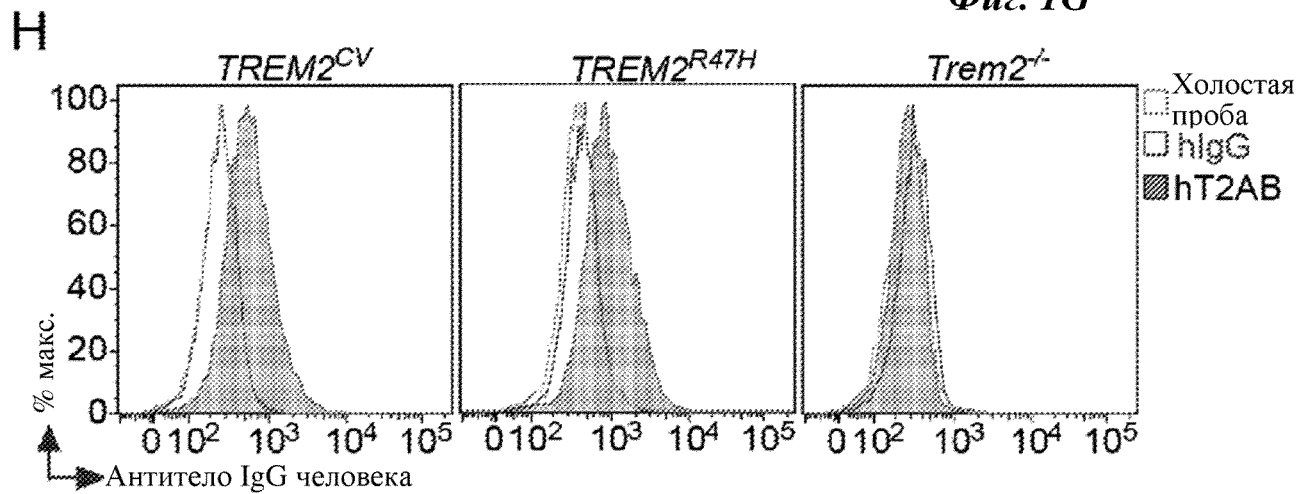
Фиг. 1Е



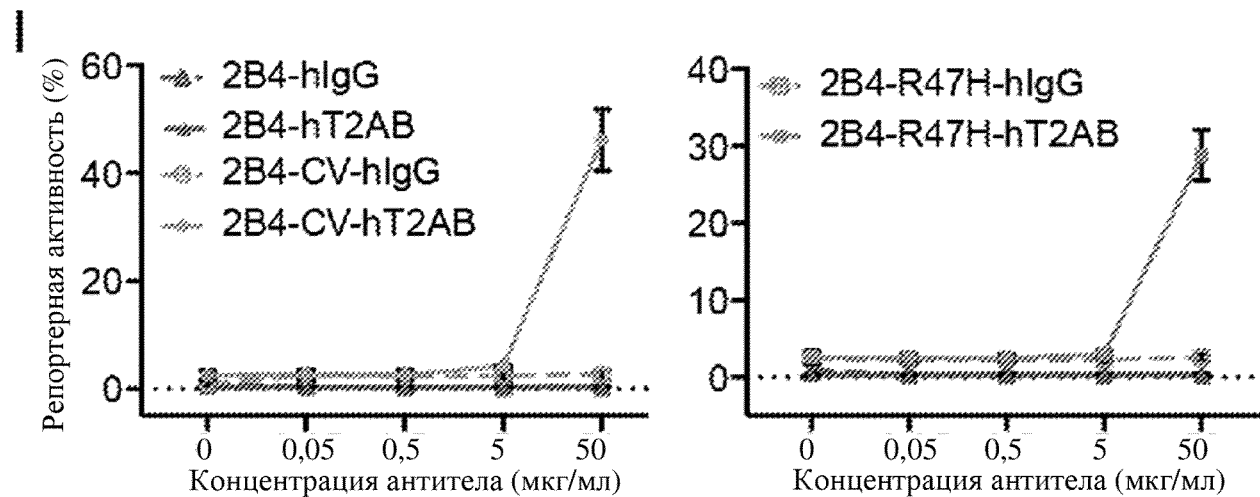
Фиг. 1Г



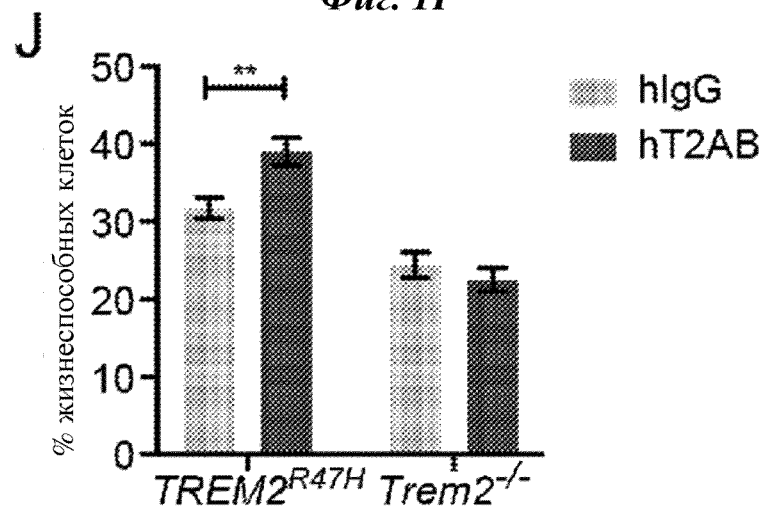
Фиг. 1Г



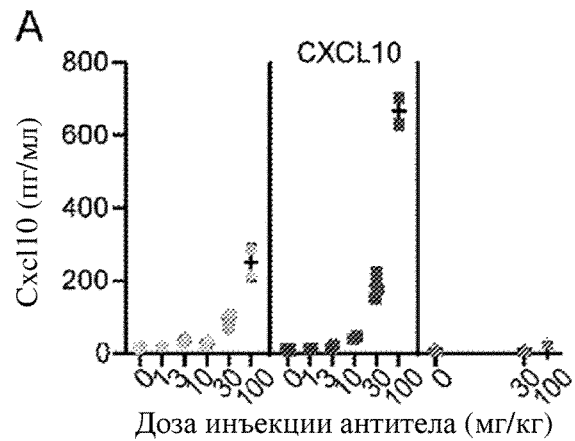
Фиг. 1Н



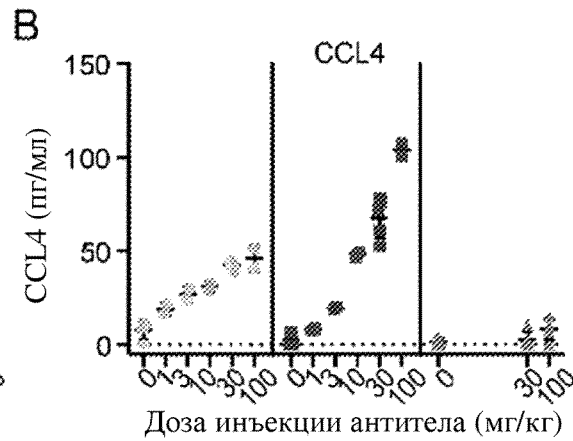
Фиг. 1I



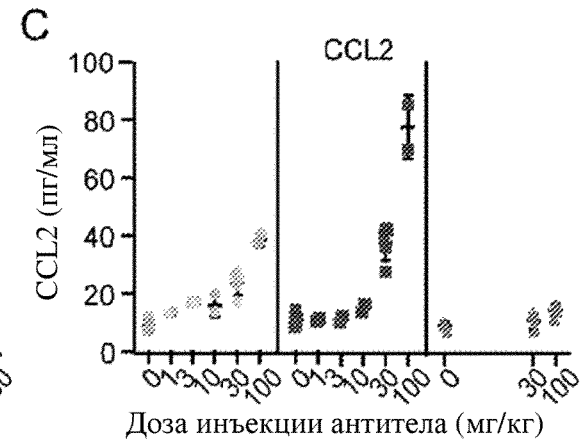
Фиг. 1J



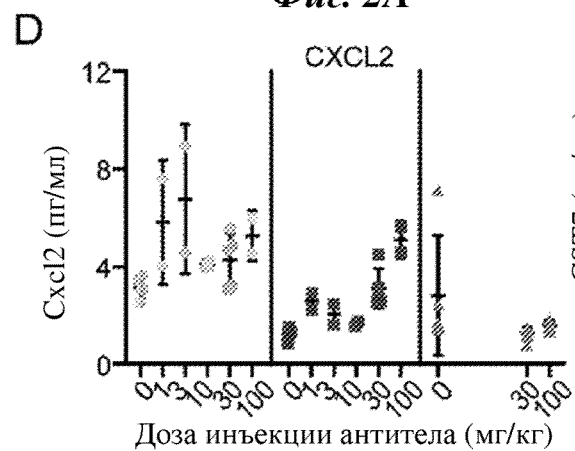
Фиг. 2А



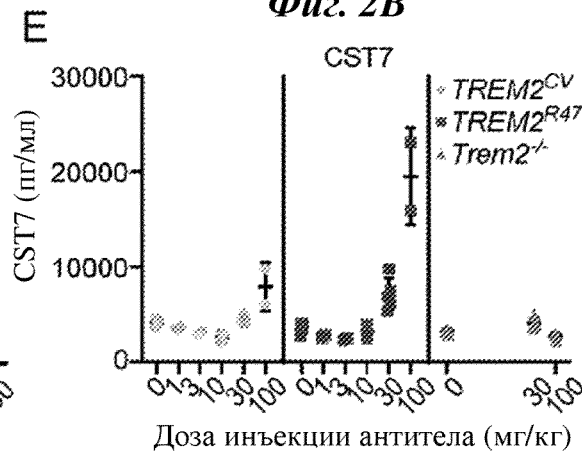
Фиг. 2В



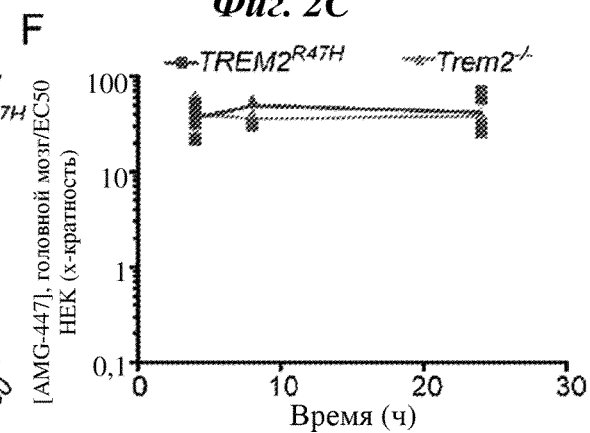
Фиг. 2С



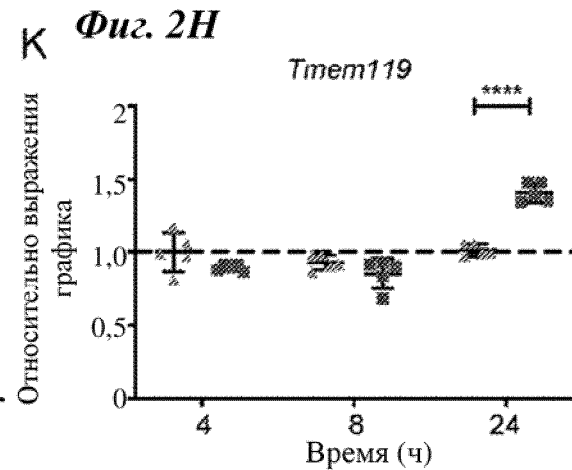
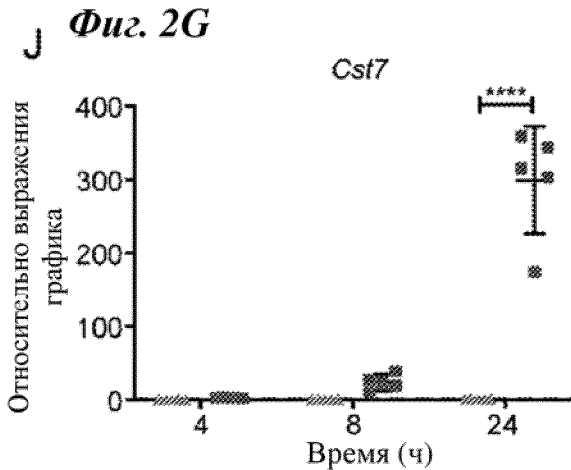
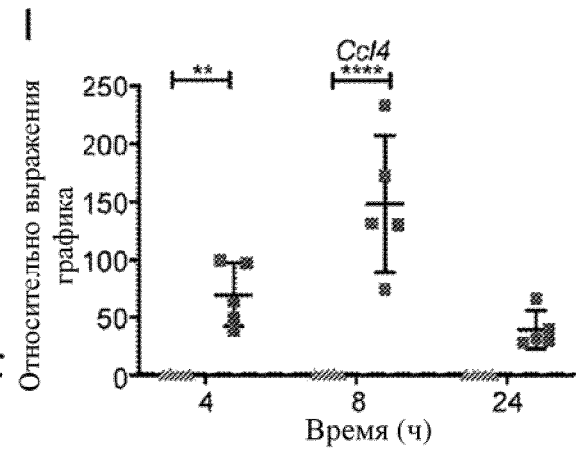
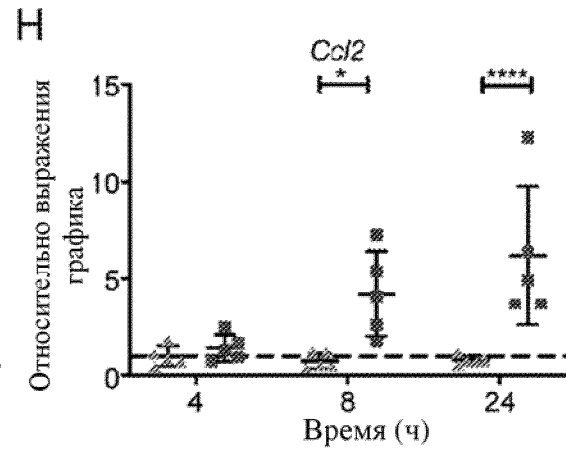
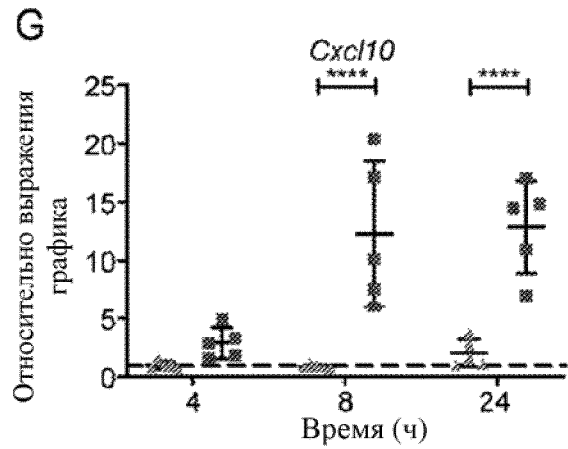
Фиг. 2D



Фиг. 2Е



Фиг. 2F



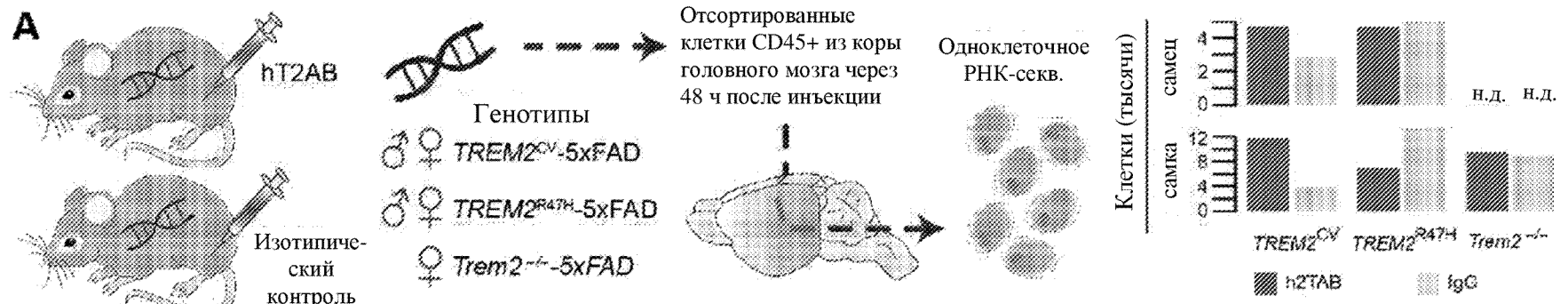
Фиг. 2G

Фиг. 2H

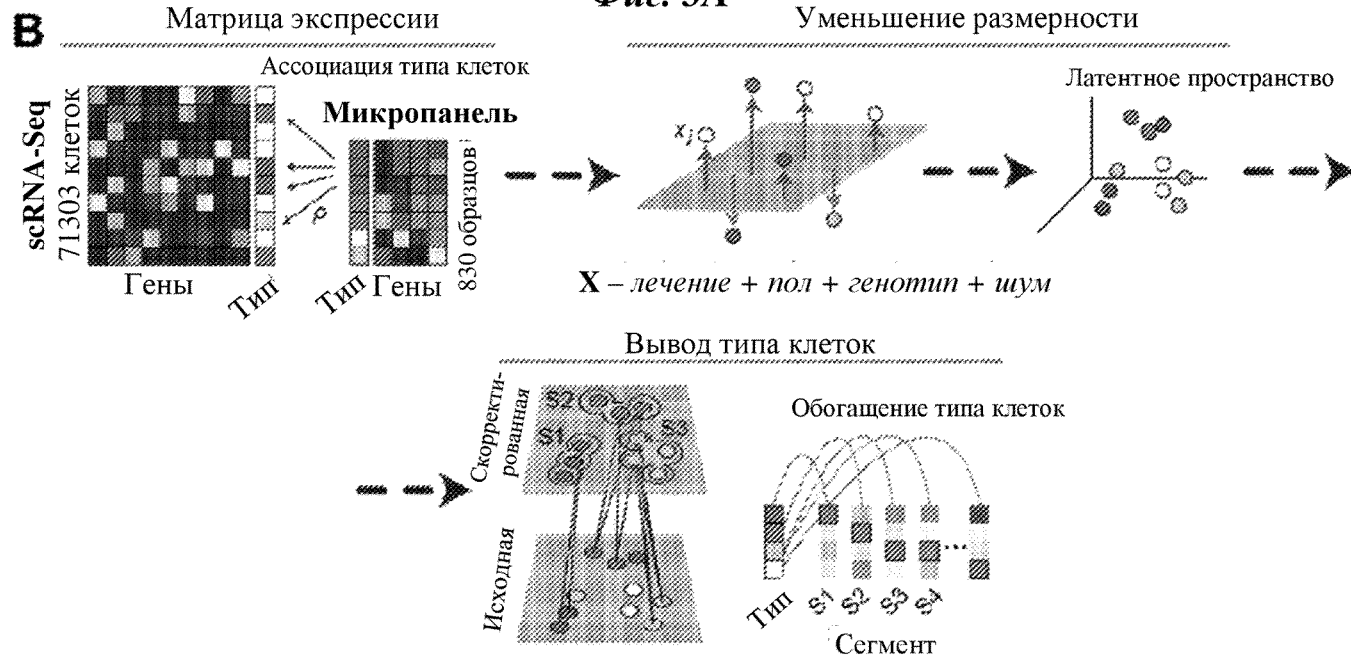
Фиг. 2I

Фиг. 2J

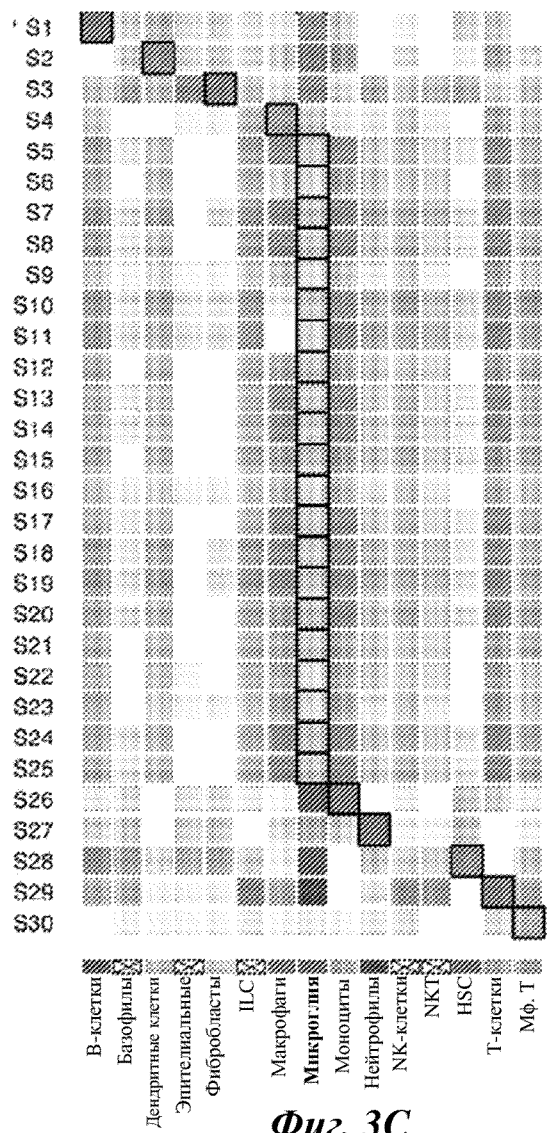
Фиг. 2K



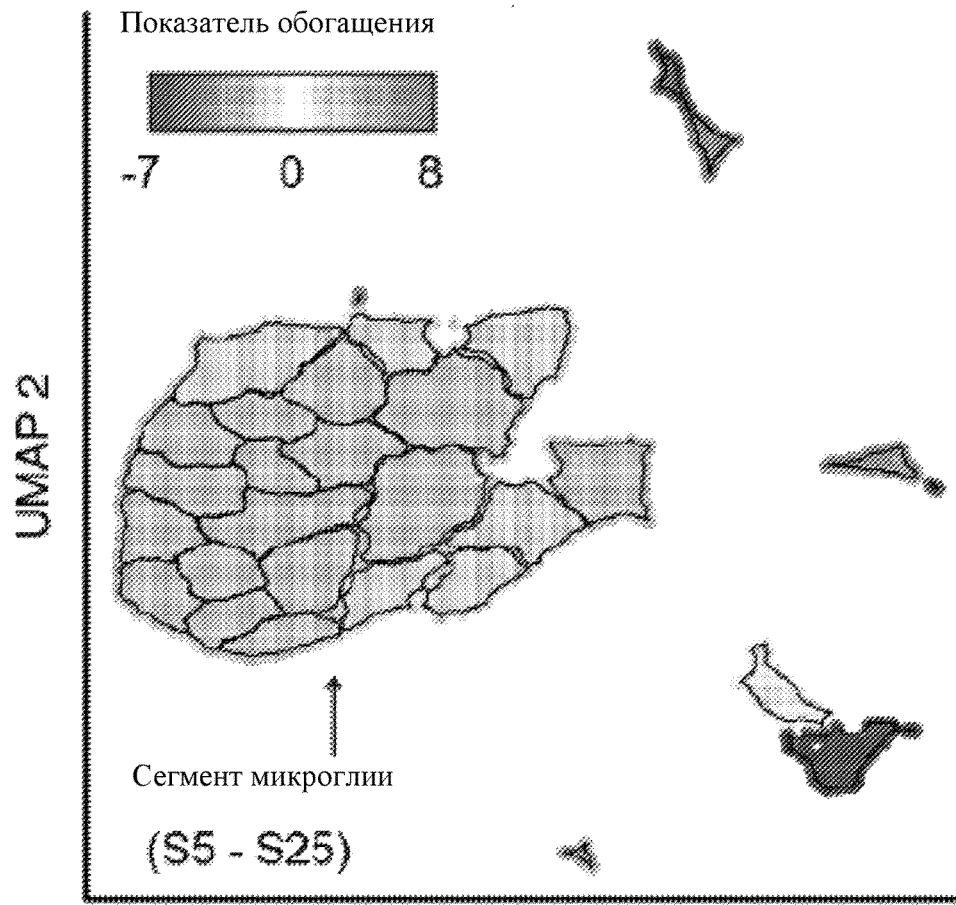
Фиг. 3А



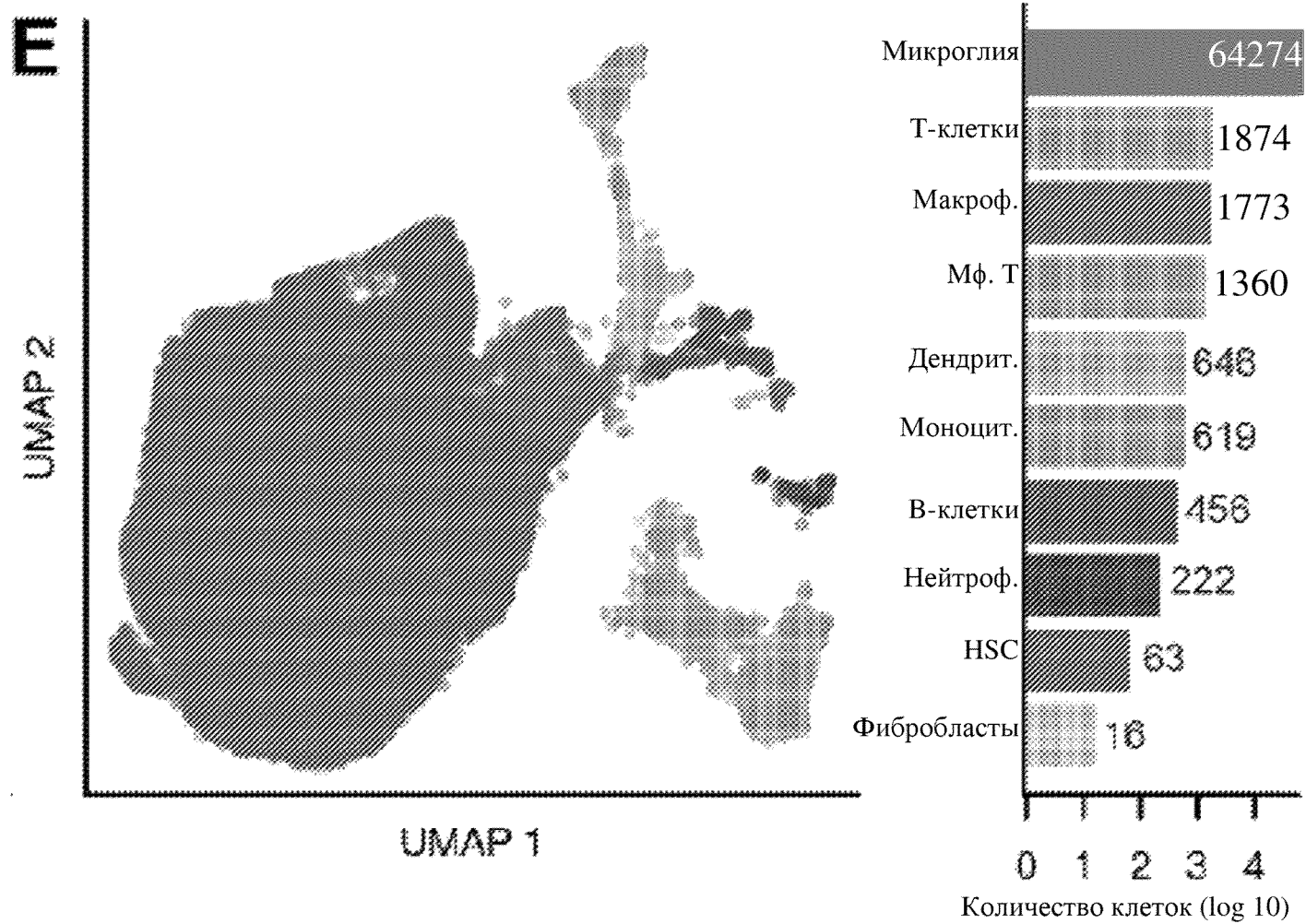
Фиг. 3В



Фиг. 3С

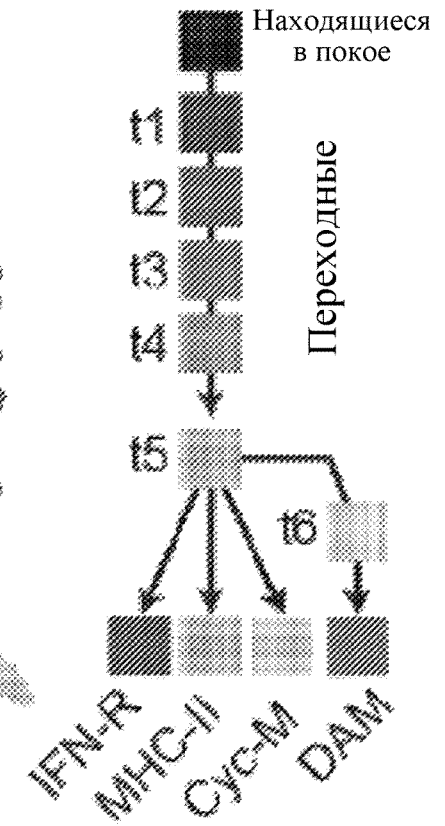
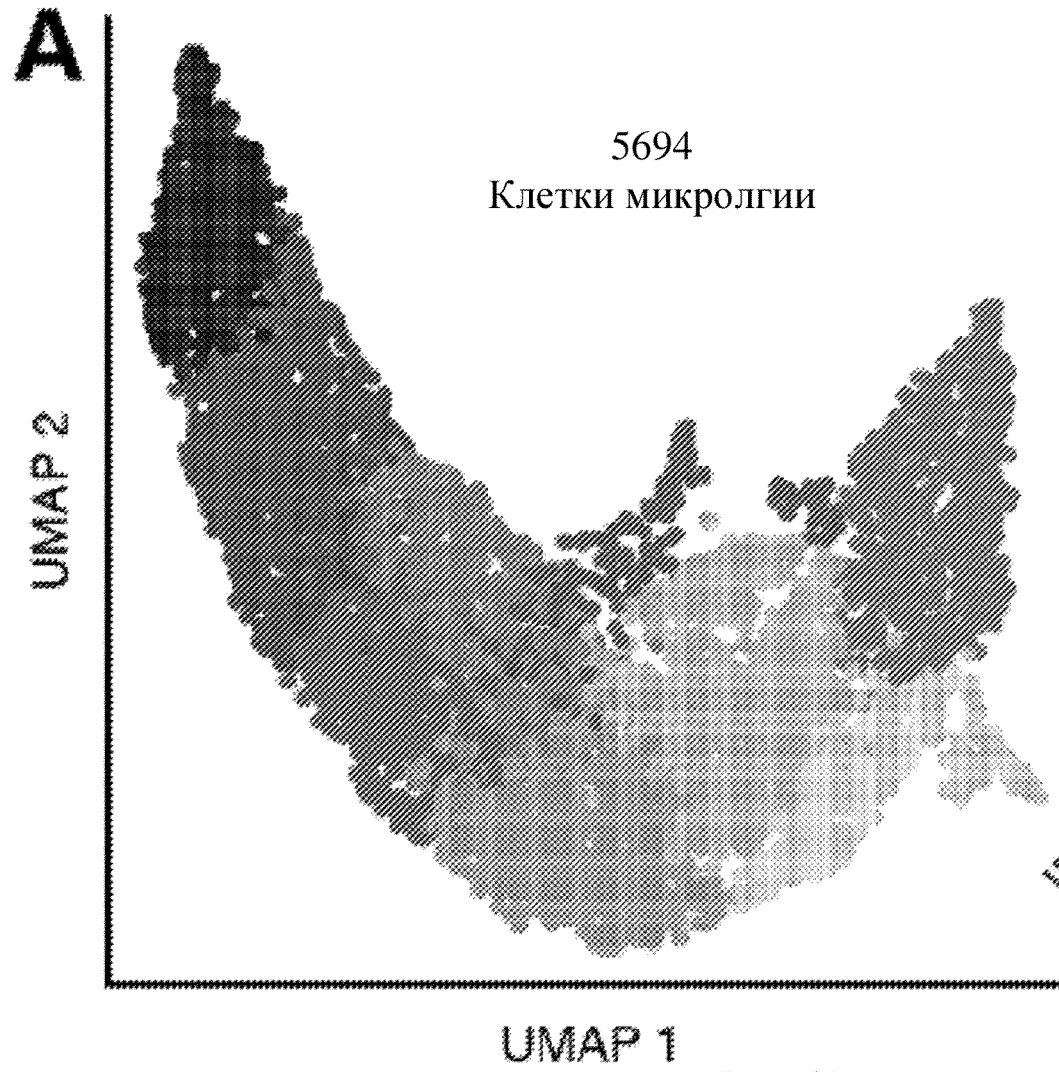


UMAP 1
Фиг. 3D

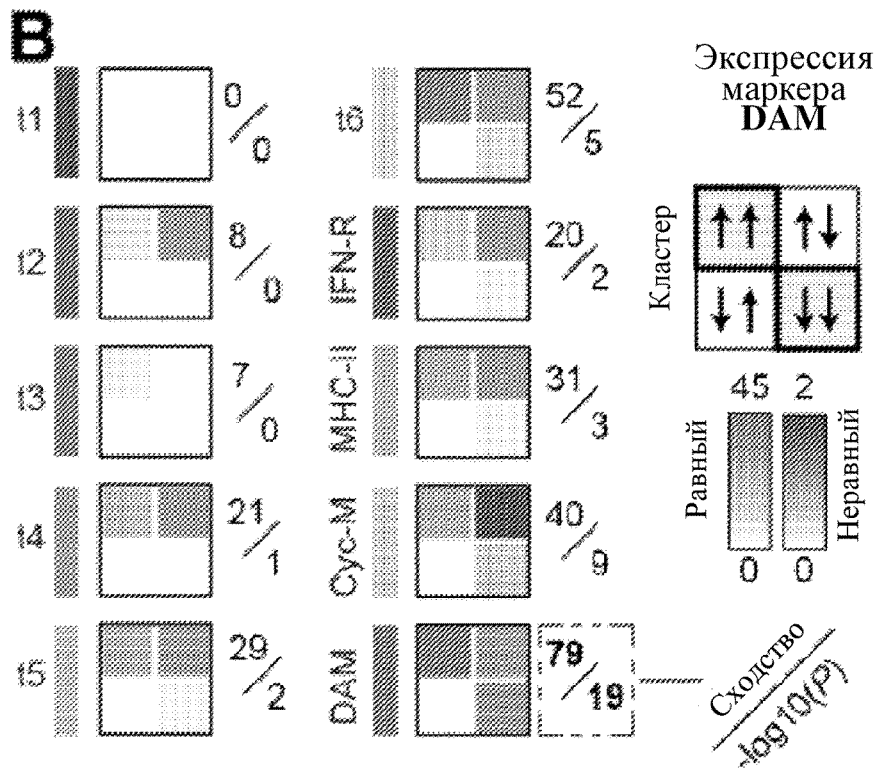


8/40

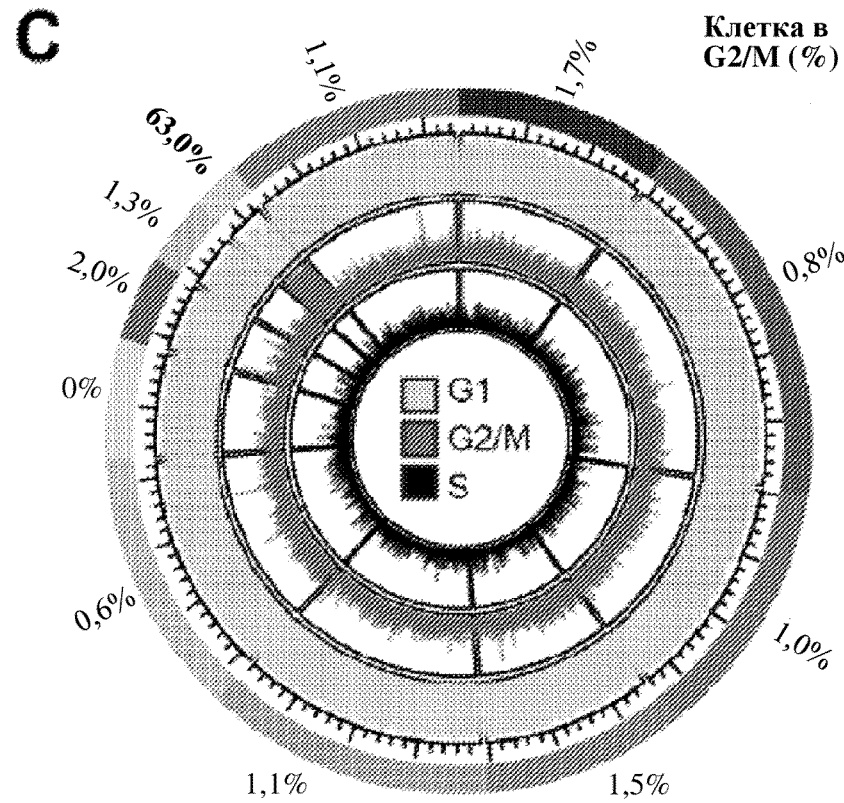
Фиг. 3E



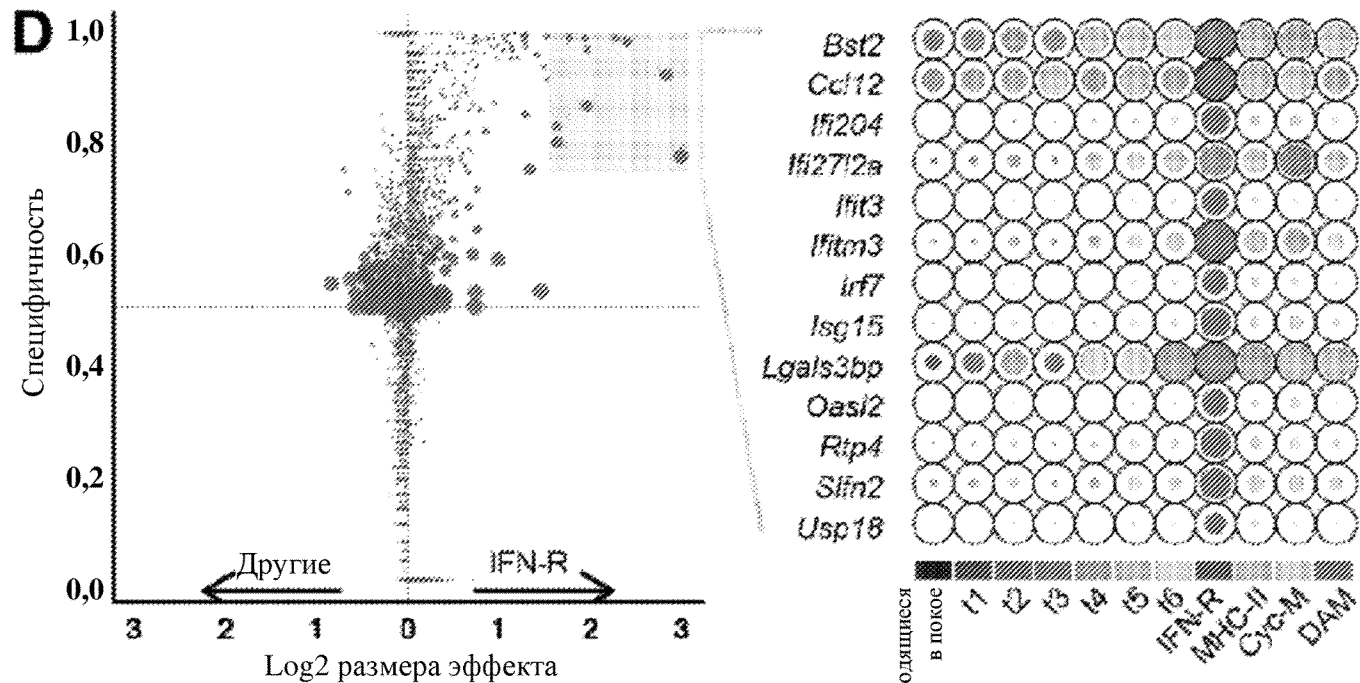
Фиг. 4А



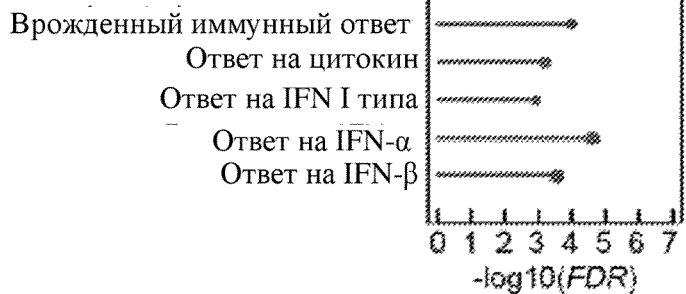
Фиг. 4В



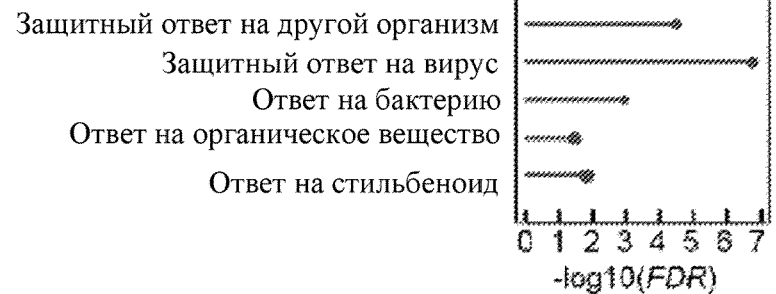
Фиг. 4С



Биологический процесс

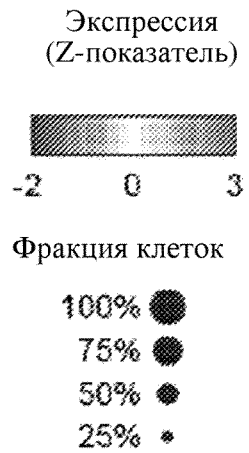
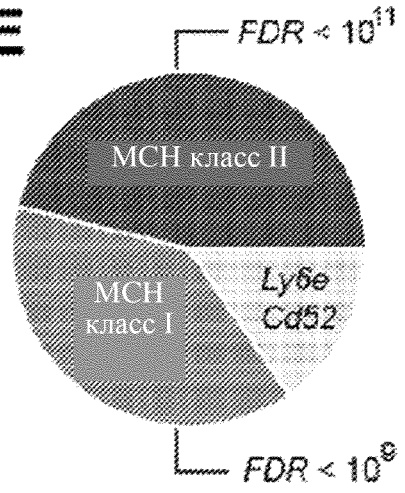


Биологический процесс

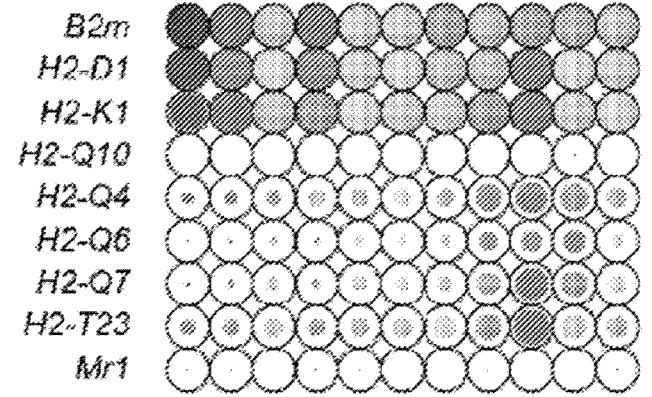


Фиг. 4D

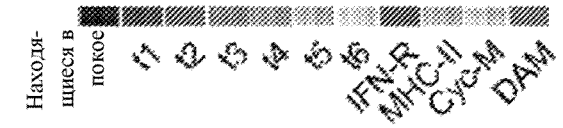
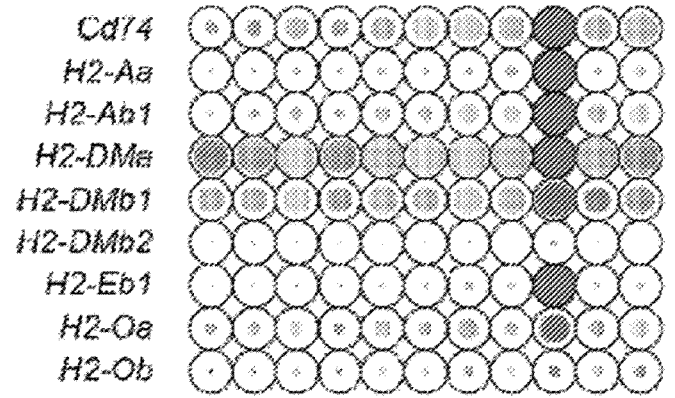
E



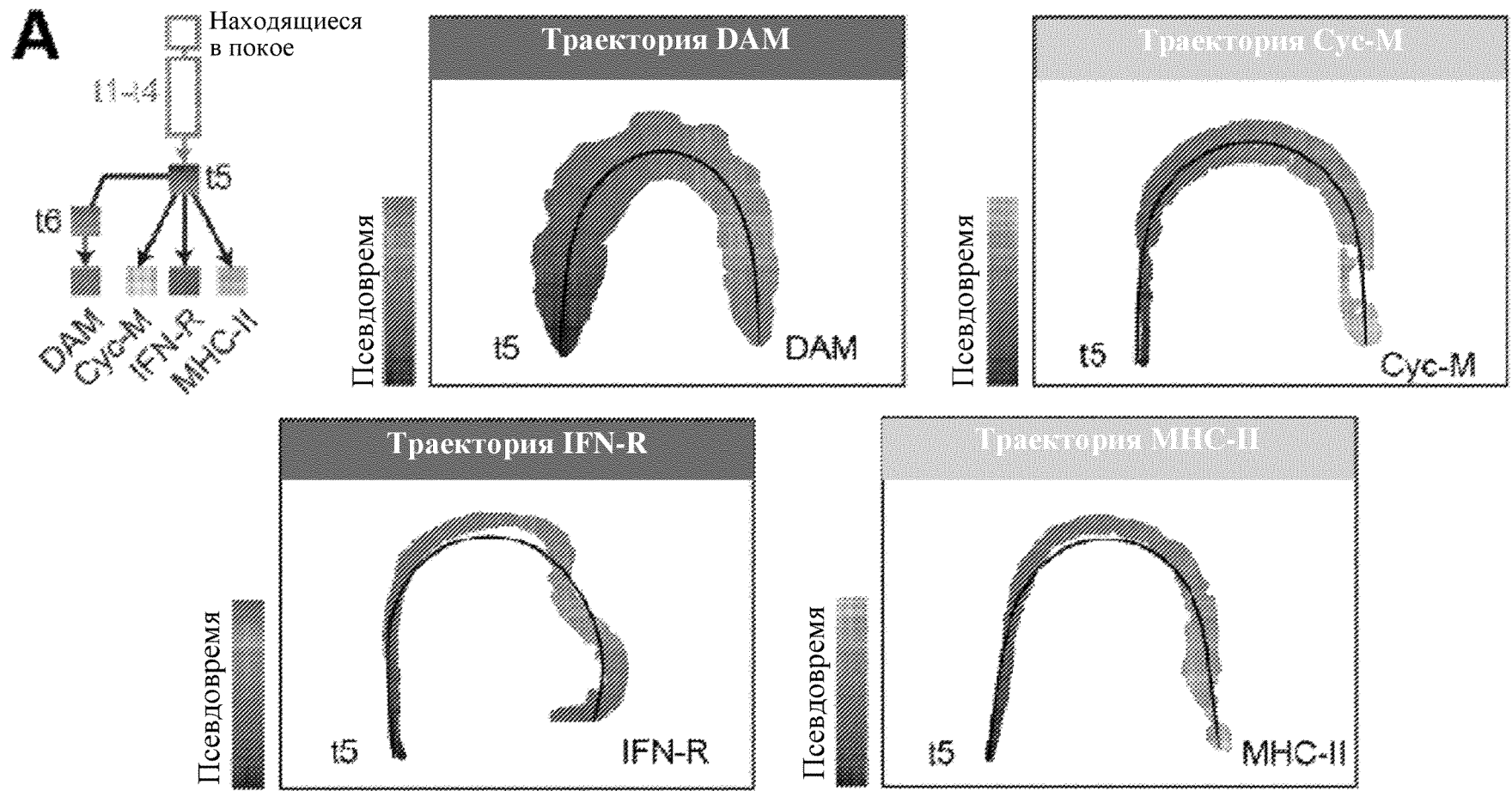
Белковый комплекс МНС класса I



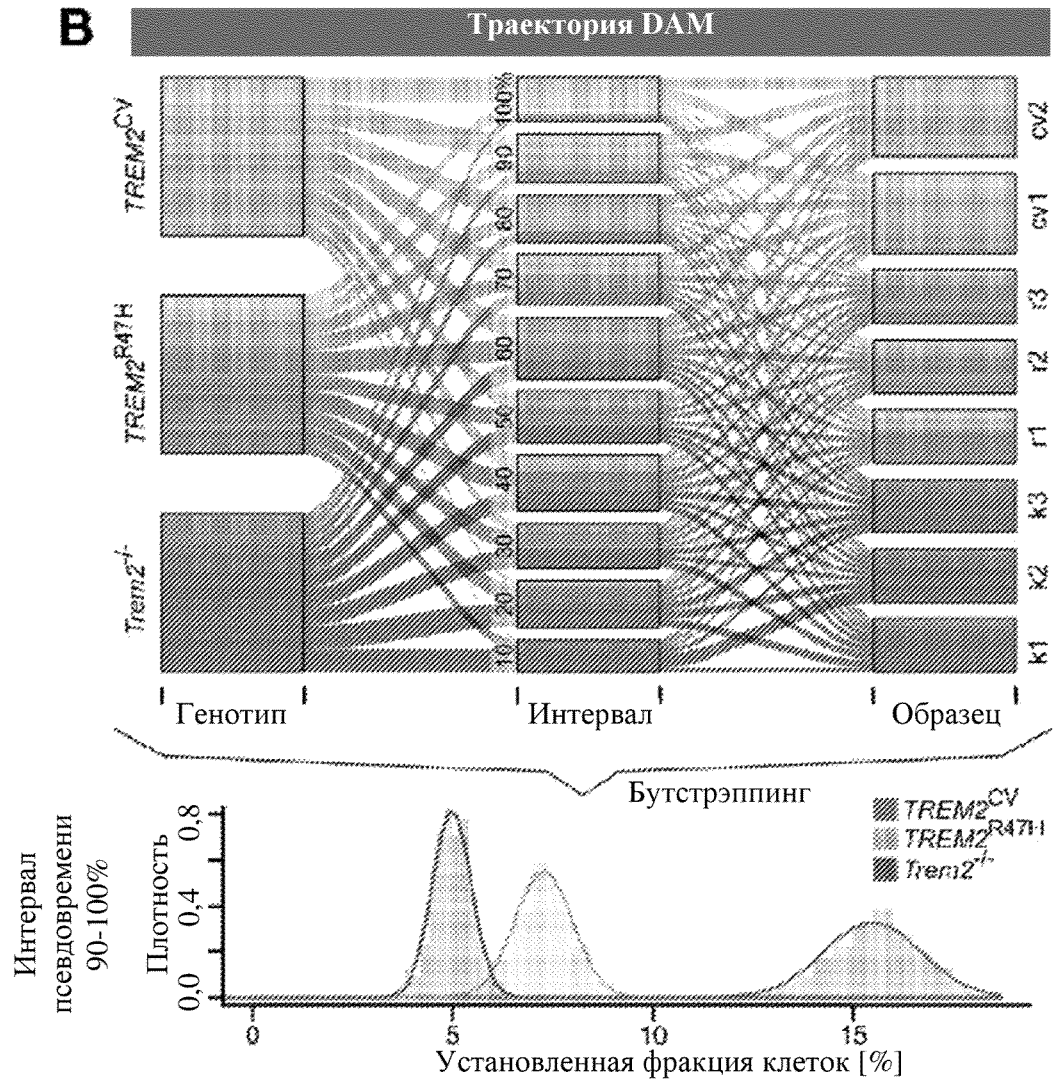
Белковый комплекс МНС класса II



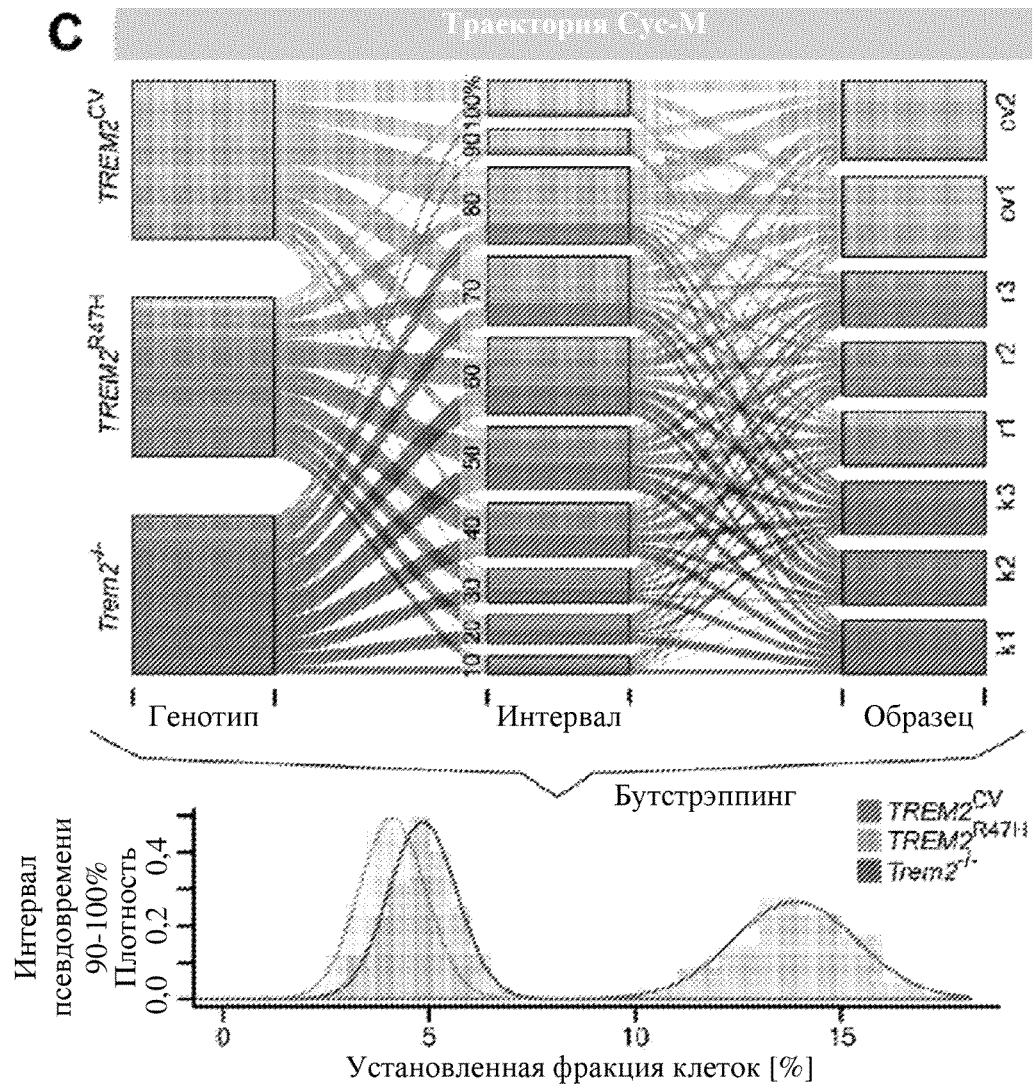
Фиг. 4E



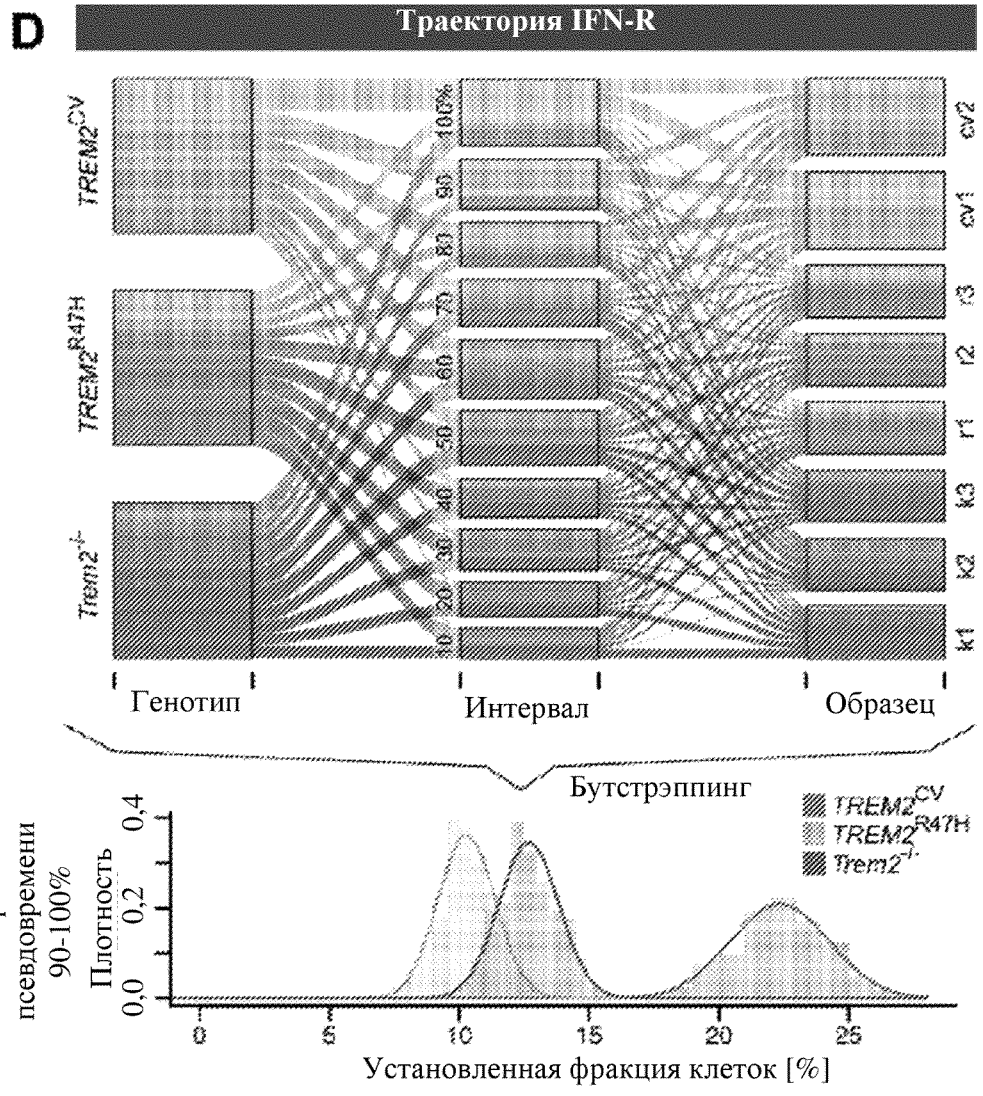
Фиг. 5А



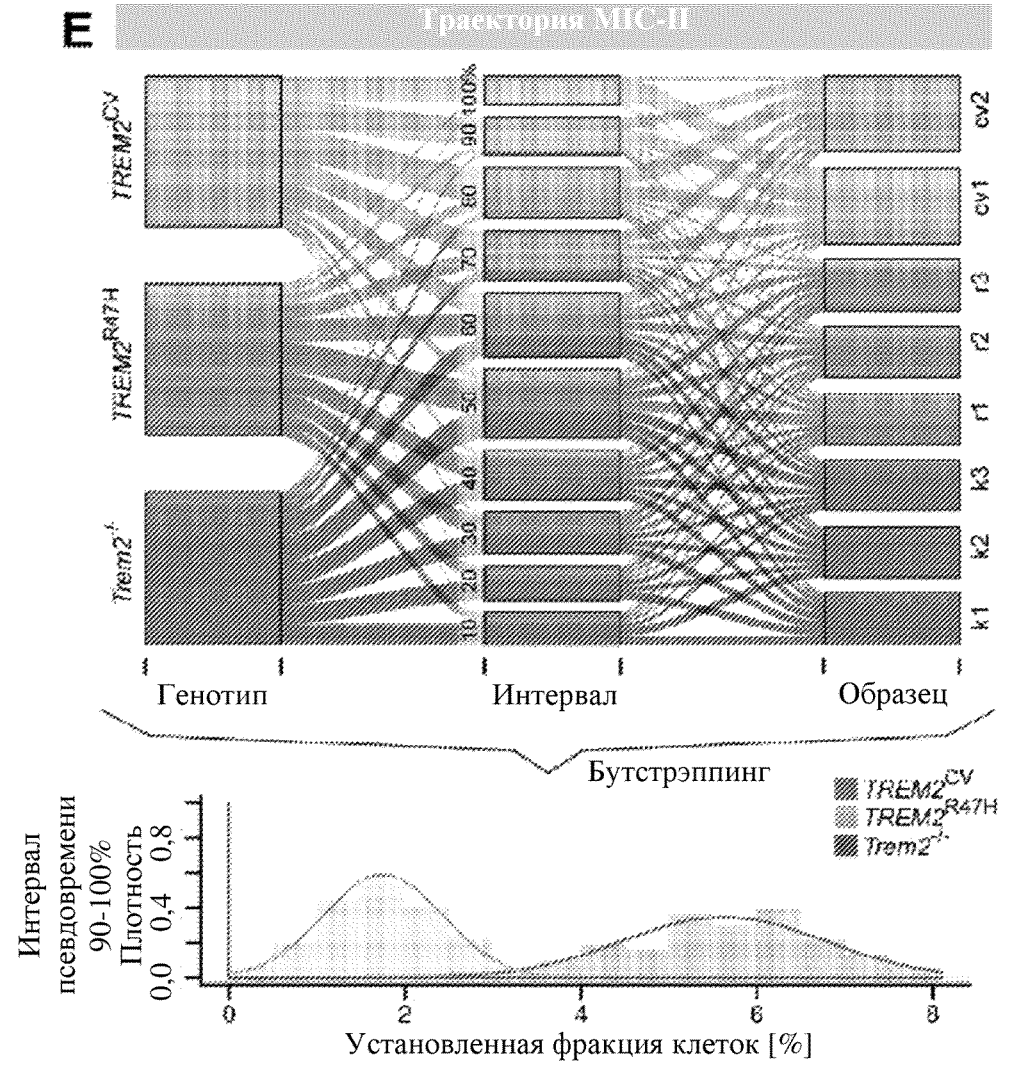
Фиг. 5B



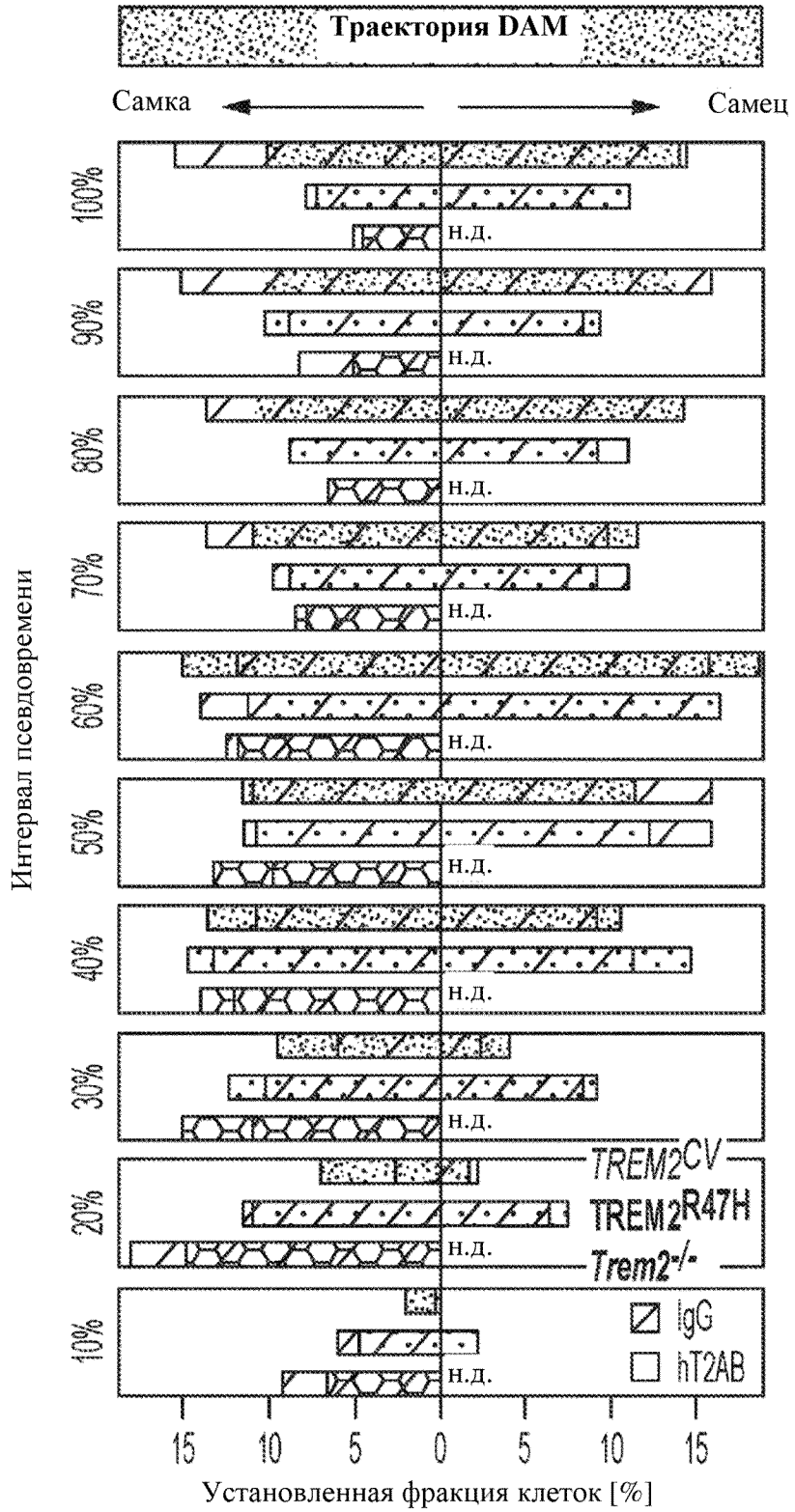
Фиг. 5С



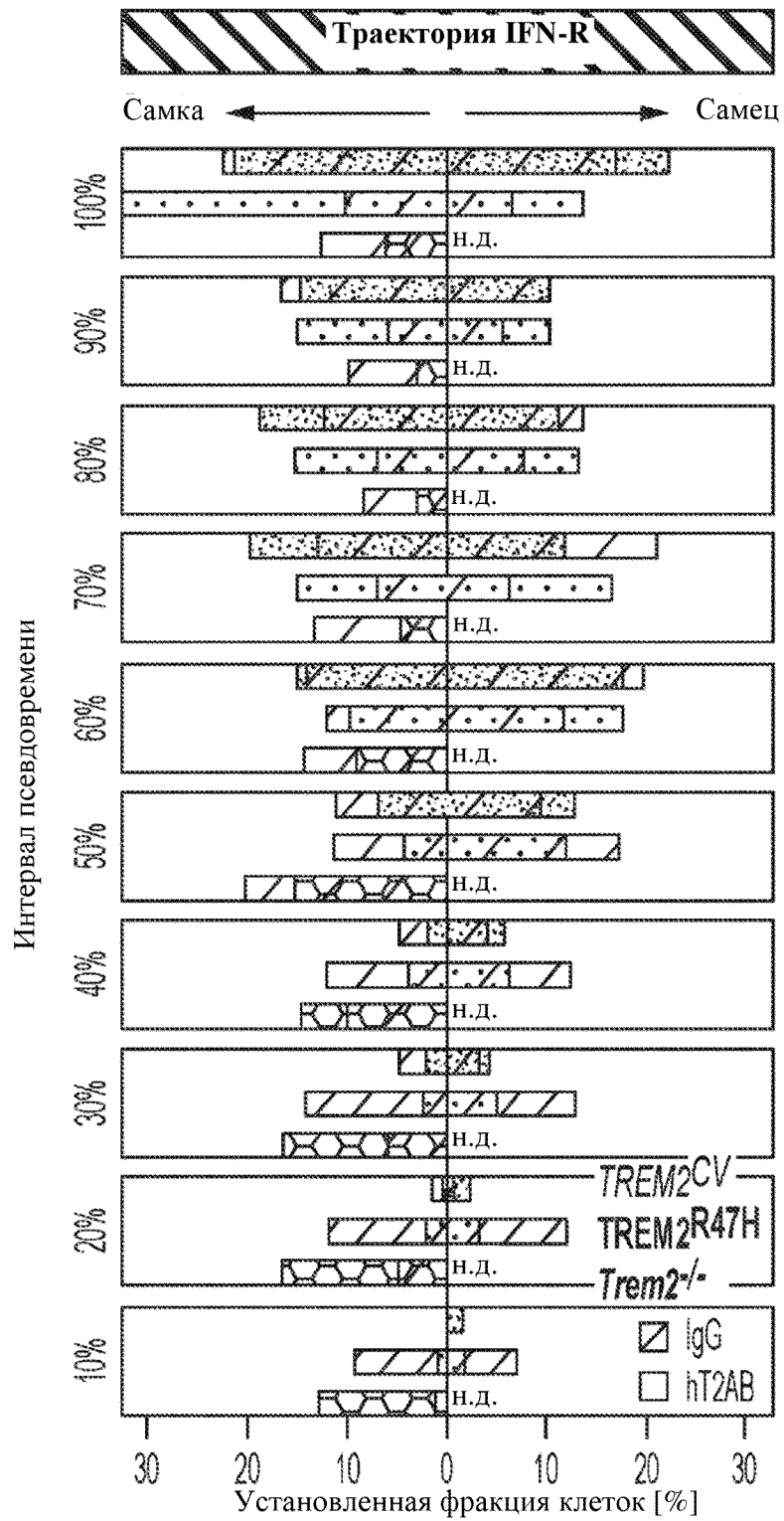
Фиг. 5D



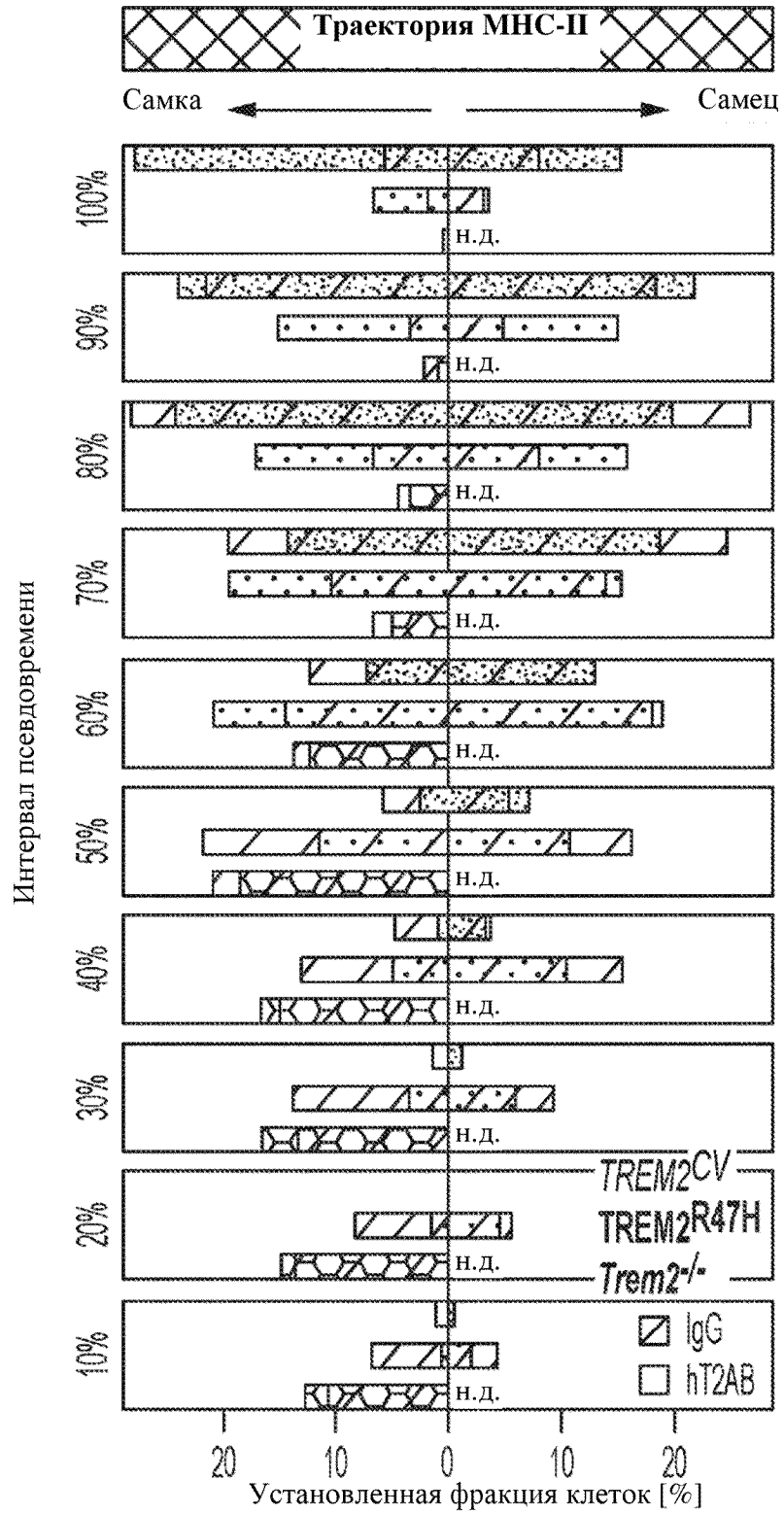
Фиг. 5E



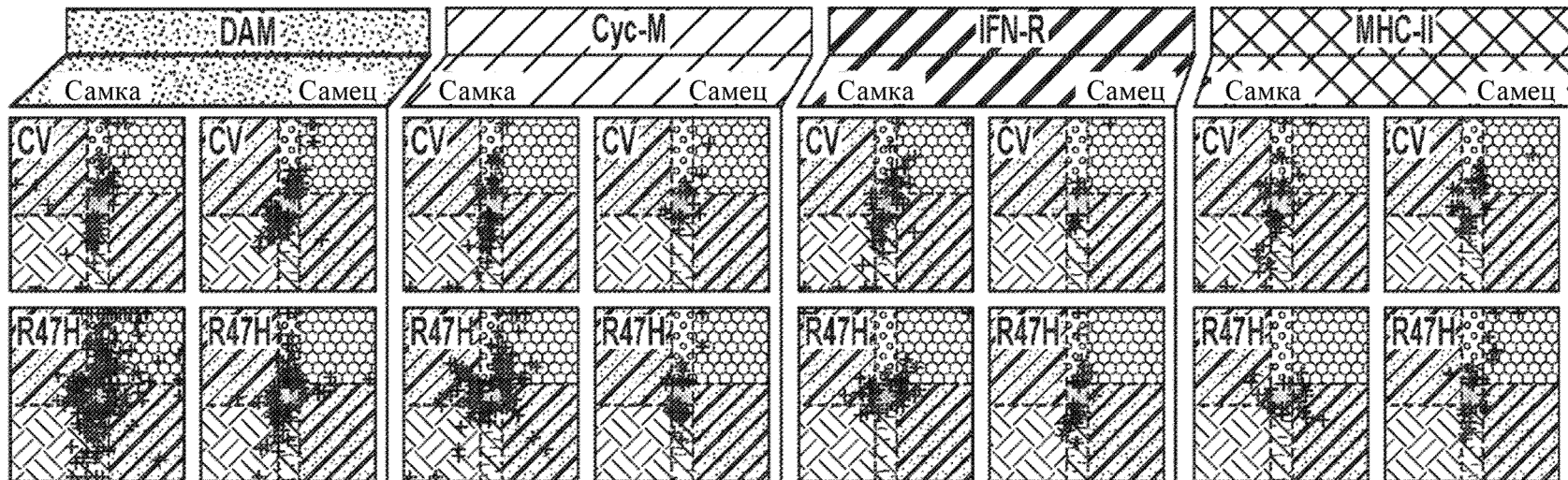
Фиг. 6А



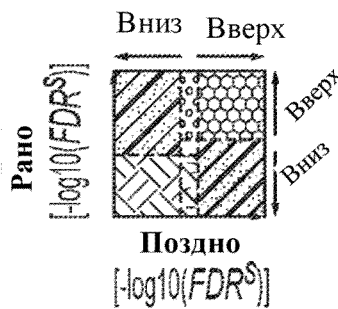
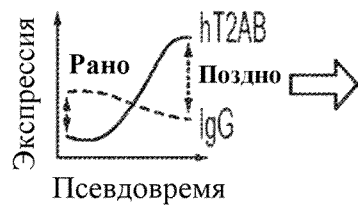
Фиг. 6А, продолжение



Фиг. 6А, продолжение



Динамика контрастирования



hT2AB-индуцированный сдвиг экспрессии

Постоянный

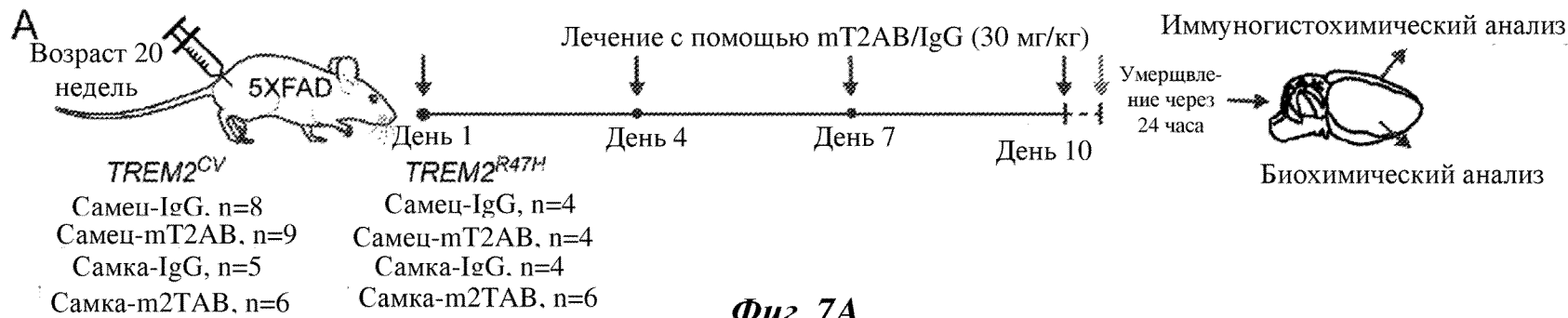
- Терминальный вниз
- Исходный вниз

Переходный

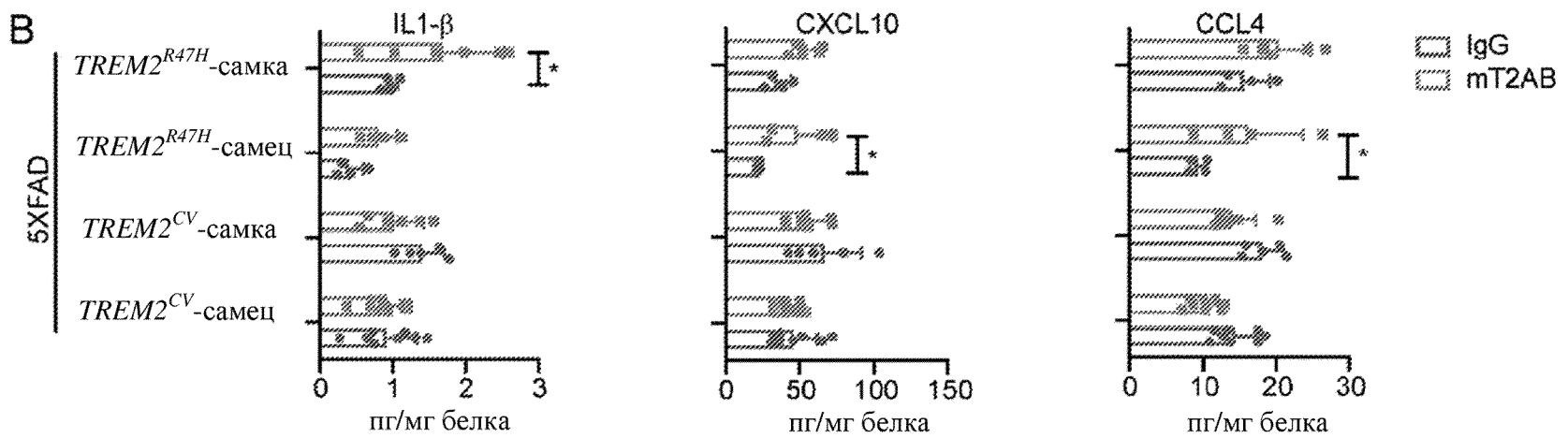
- Исходный вверх
- Терминальный вверх
- Вверх + Ген
- Вниз

-- $FDR < 0,01$

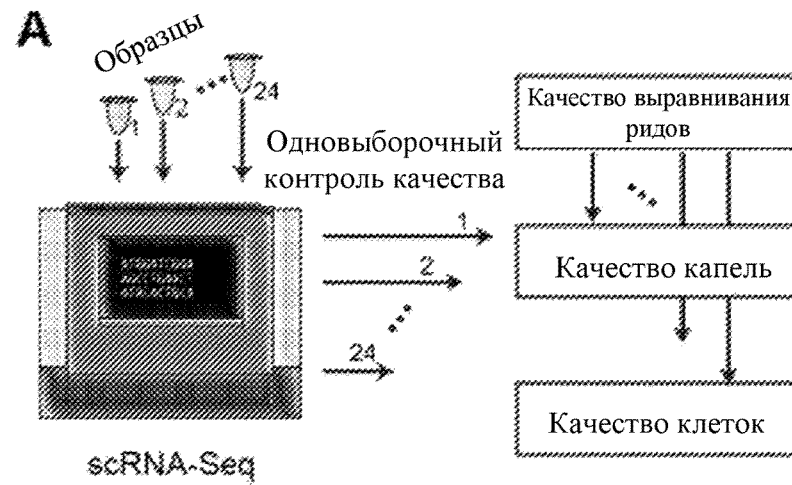
Фиг. 6B



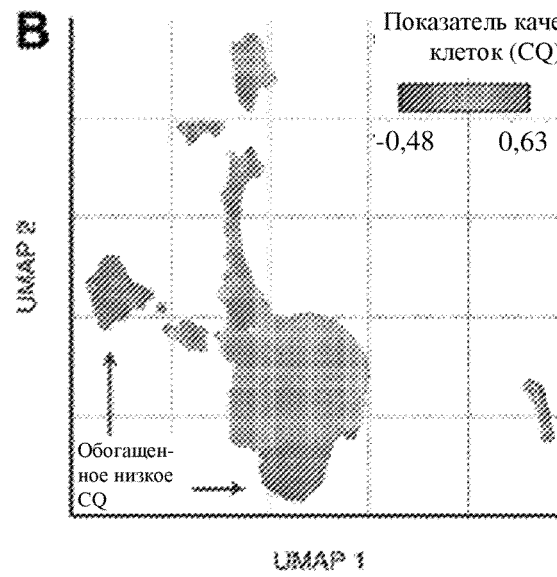
Фиг. 7А



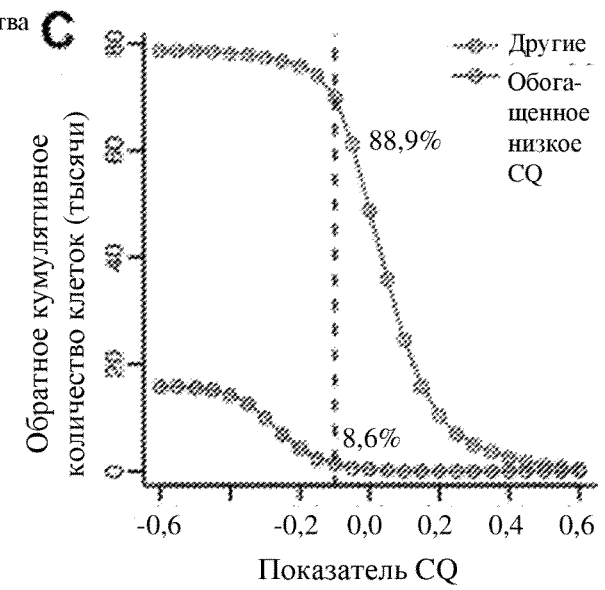
Фиг. 7В



Фиг. S1A



Фиг. S1B



Фиг. S1C

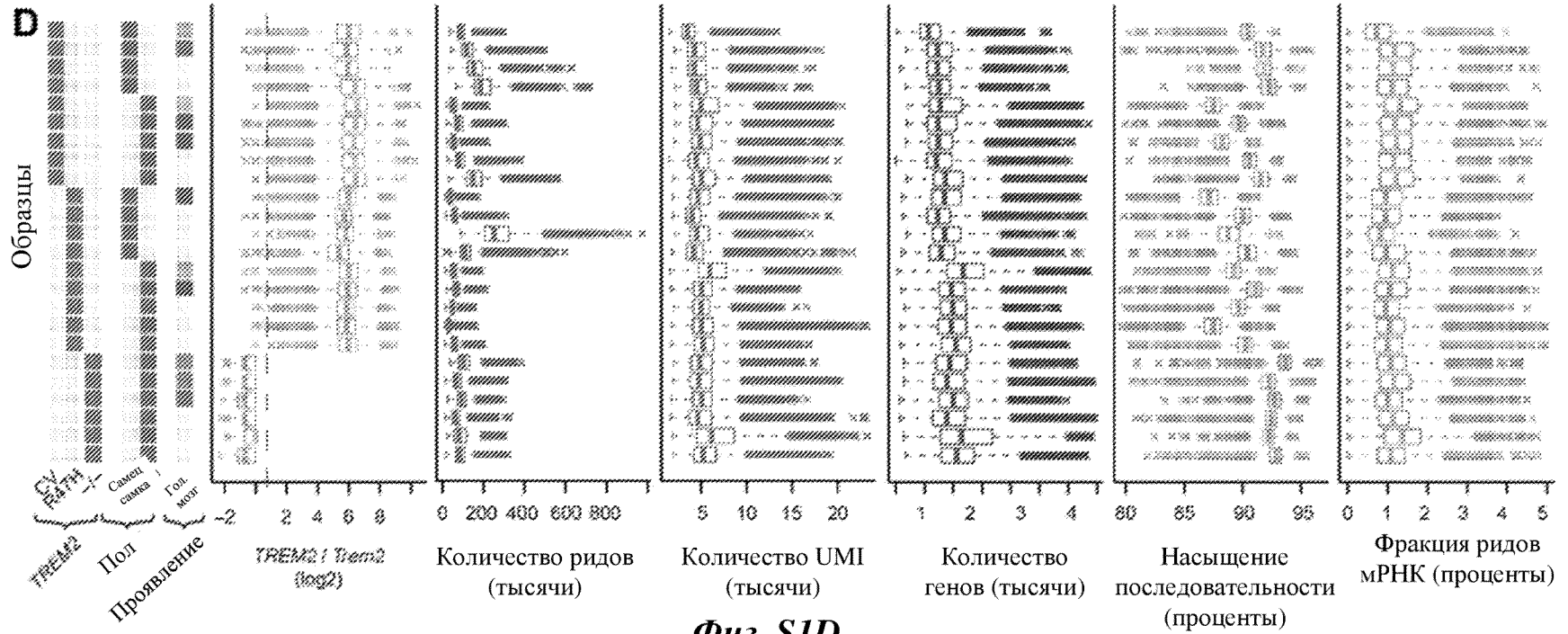
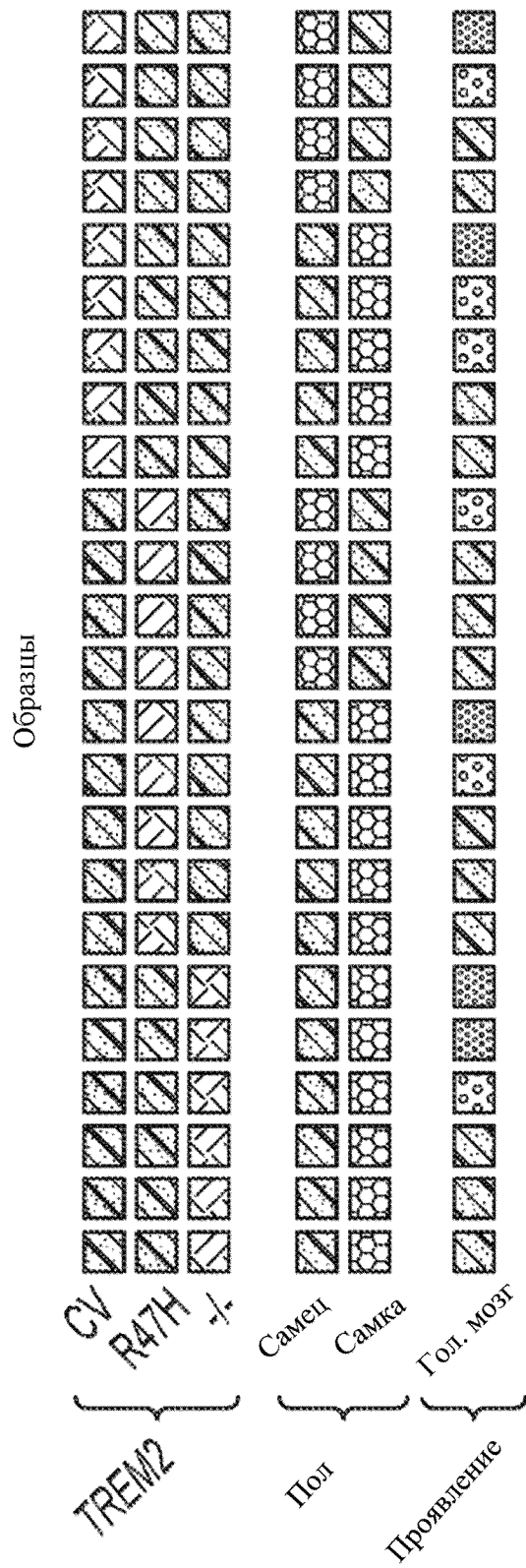
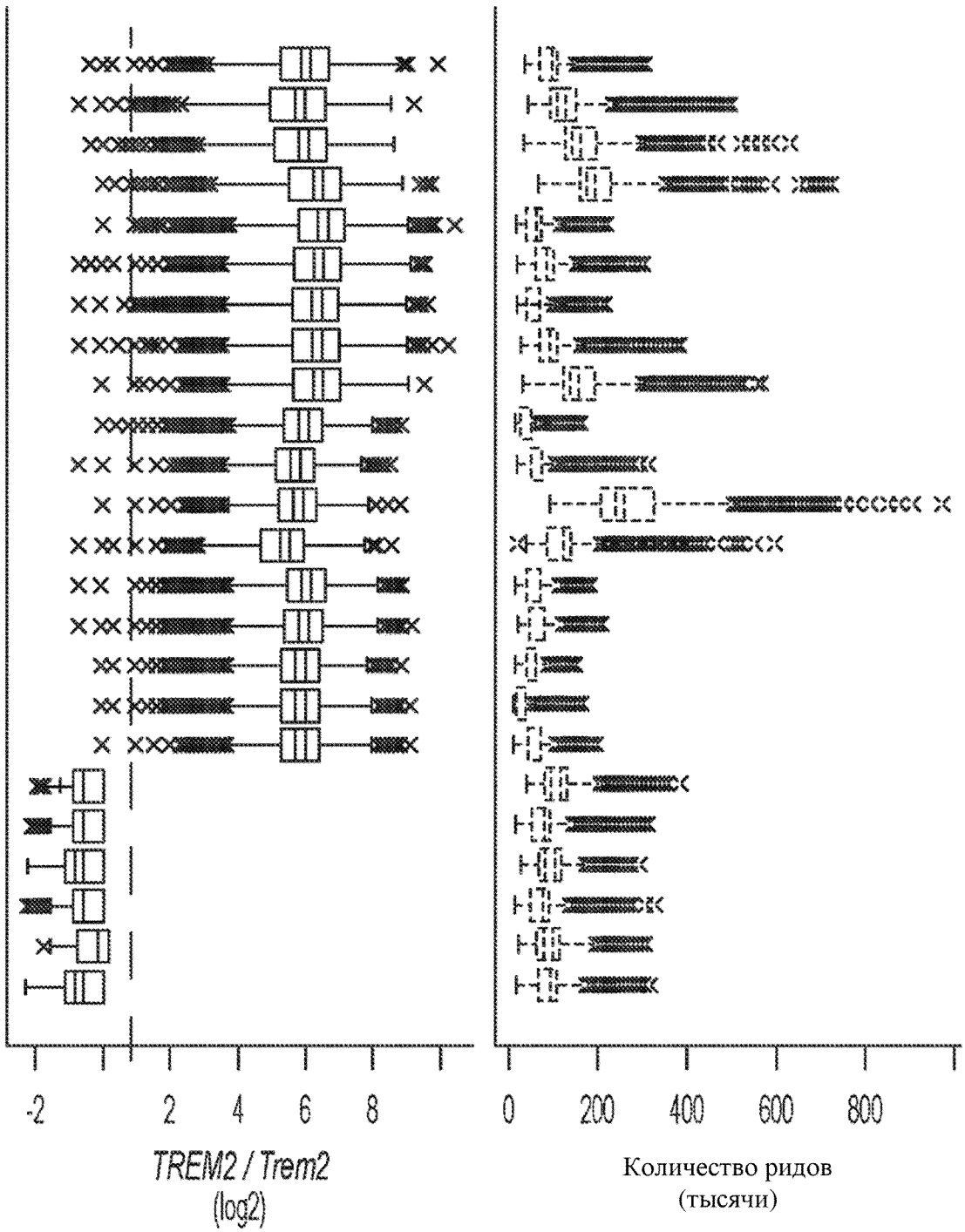


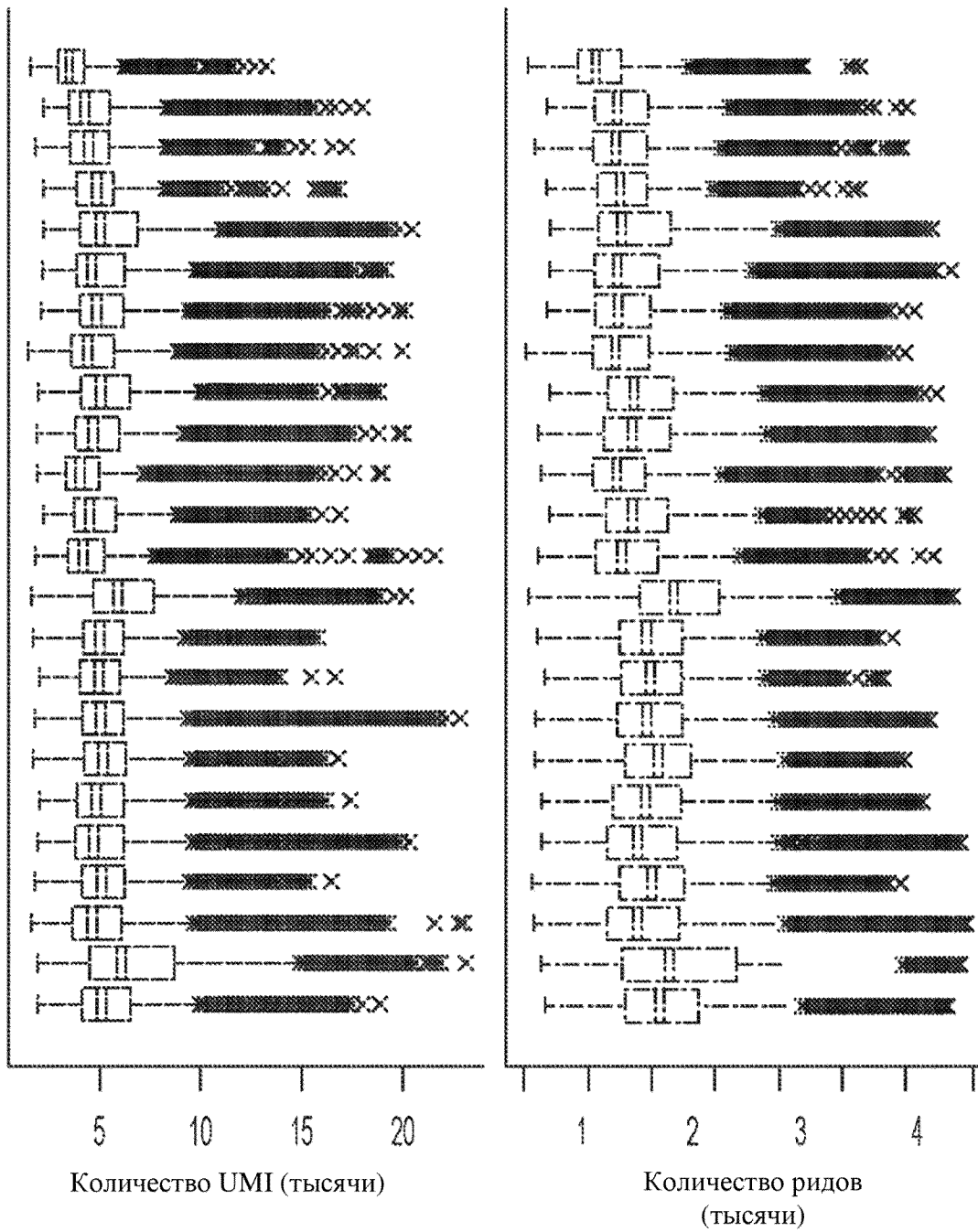
Fig. SID



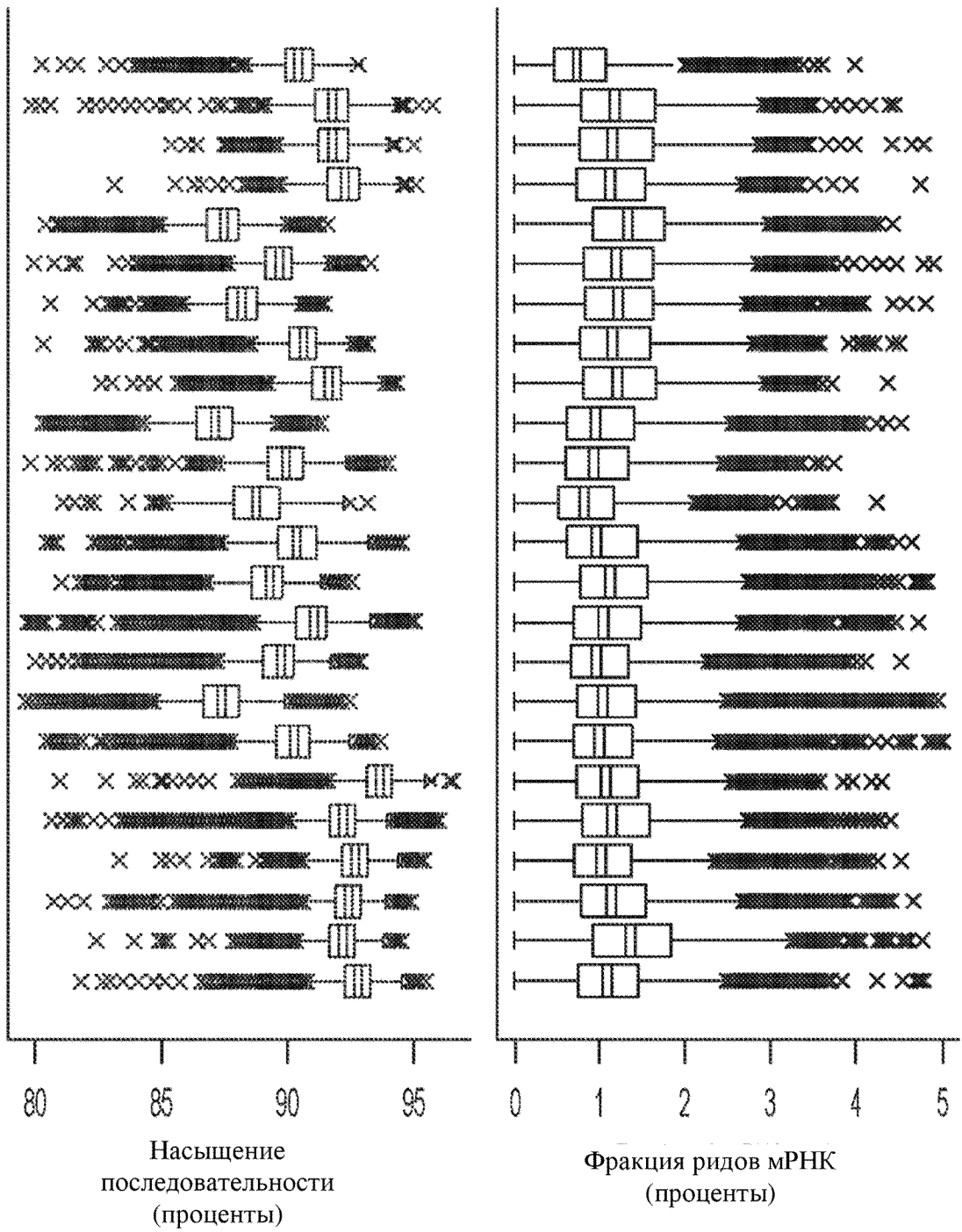
Фиг. S1D




Фиг. S1D, продолжение



Фиг. SID, продолжение



Фиг. S1D, продолжение

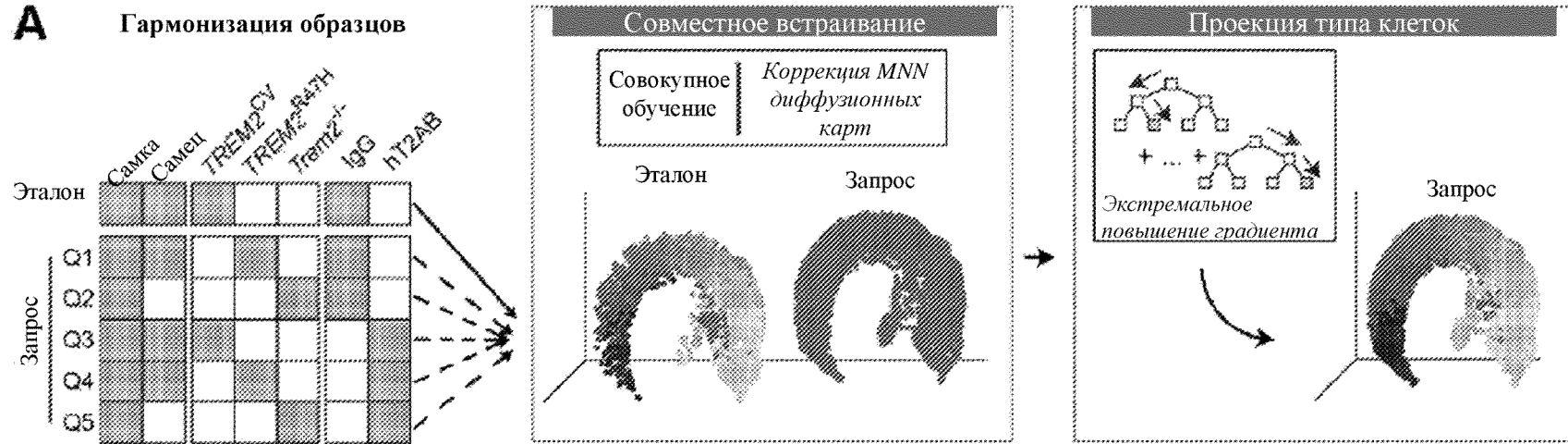
Уровень
ложноположительных
результатов
0,05  1E-9,5

Обогащение терминов геномной онтологии: биологический процесс
(микроблия IFN-R)

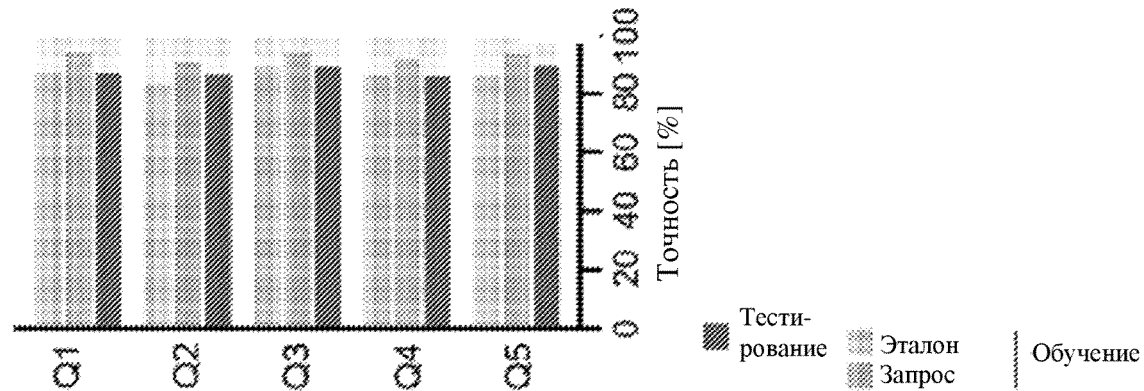
Межвидовое взаимодействие между организмами (GO:0044419)	Реакция на внешний раздражитель (GO:0009605)	Ответ на другой организм (GO:0051707)	Отрицательная регуляция репликации вирусного генома (GO:0045071)	Отрицательная регуляция вирусного процесса (GO:0048525)	Регуляция симбиоза, включая мутуализм через паразитизм (GO:0043903)		
Ответ на биотический раздражитель (GO:0009607)	Процесс иммунной системы (GO:0002376)	Защитный ответ (GO:0006952)	Защитный ответ на другой организм (GO:0098542)	Отрицательная регуляция вирусного жизненного цикла (GO:1903901)	Регуляция вирусного генома (GO:0045069)	Регуляция вирусного жизненного цикла (GO:1903900)	Регуляция вирусного процесса (GO:0050792)
Ответ на внешний биотический раздражитель (GO:0043207)	Ответ на стресс (GO:0006950)	Иммунный ответ (GO:0006955)	Ответ на интерферон типа I (GO:0034340)	Ответ на вирус (GO:0009615)	Защитный ответ на вирус (GO:0051607)	Процесс в отношении иммунного эффектора (GO:0002252)	
Ответ на раздражитель (GO:0050896)	Ответ на химическое вещество (GO:0042221)	Врожденный иммунный ответ (GO:0045087)	Клеточный ответ на интерферон типа I (GO:0071357)	Ответ на цитокин (GO:0034097)	Клеточный ответ на цитокиновый раздражитель (GO:0071345)	Ответ на бактерию (GO:0009617)	
	Ответ на органическое вещество (GO:0010033)	Сигнальный путь интерферона типа I (GO:0060337)	Ответ на стильбеноид (GO:0035634)	Ответ на интерферон-альфа (GO:0035455)	Клеточный ответ на интерферон-альфа (GO:0035457)	Ответ на интерферон-бета (GO:0035456)	

Фиг. S2

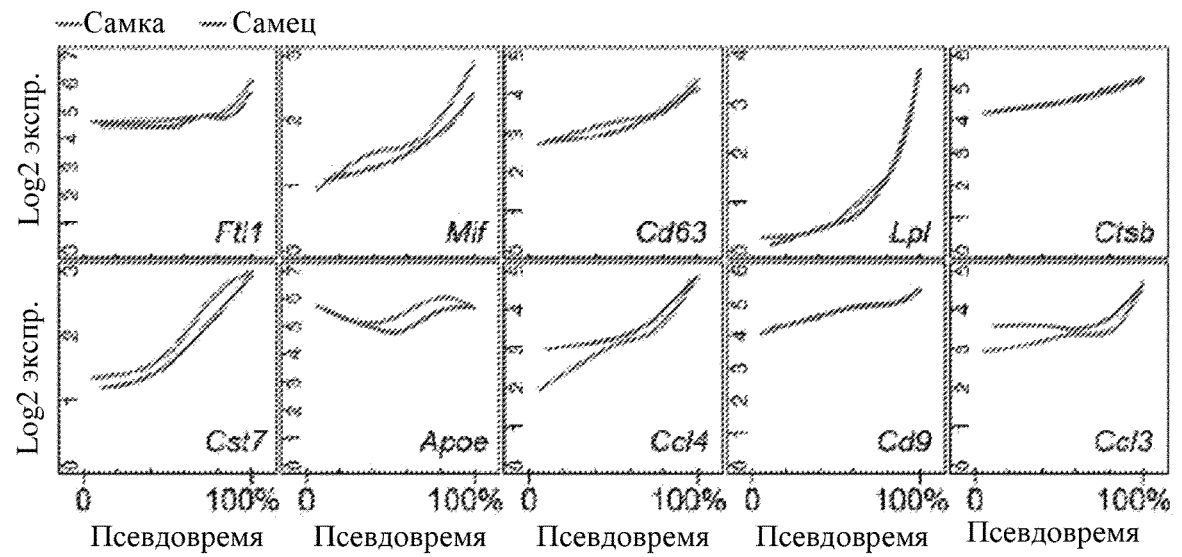
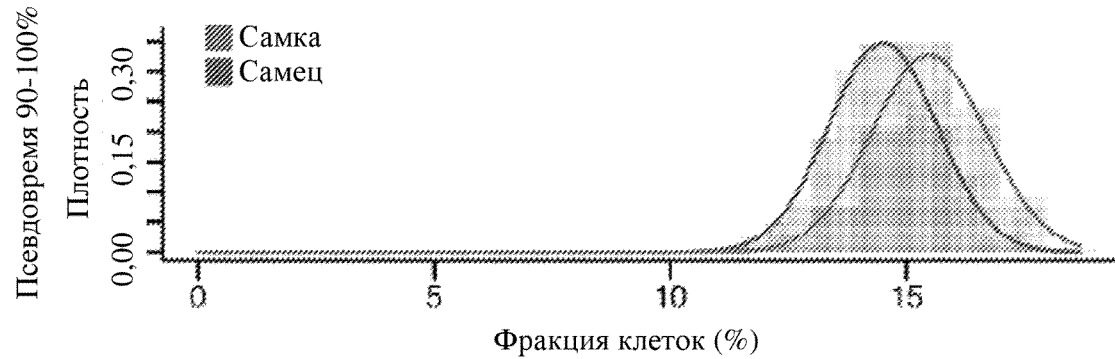
A Гармонизация образцов



Фиг. S3A

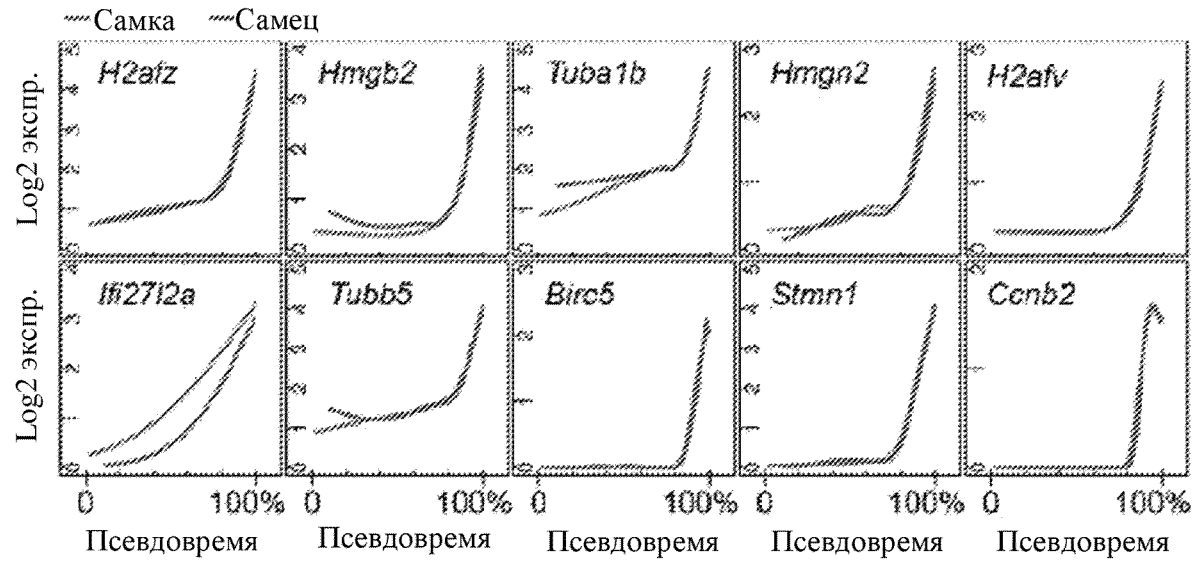
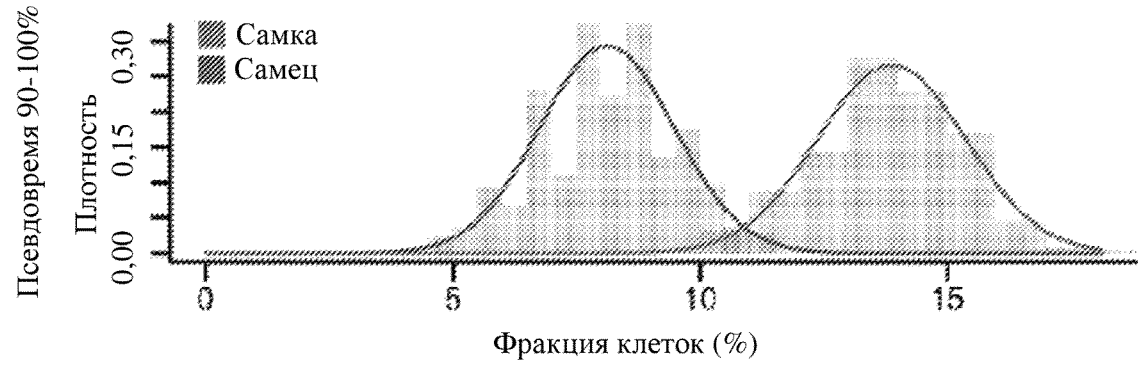


Фиг. S3B

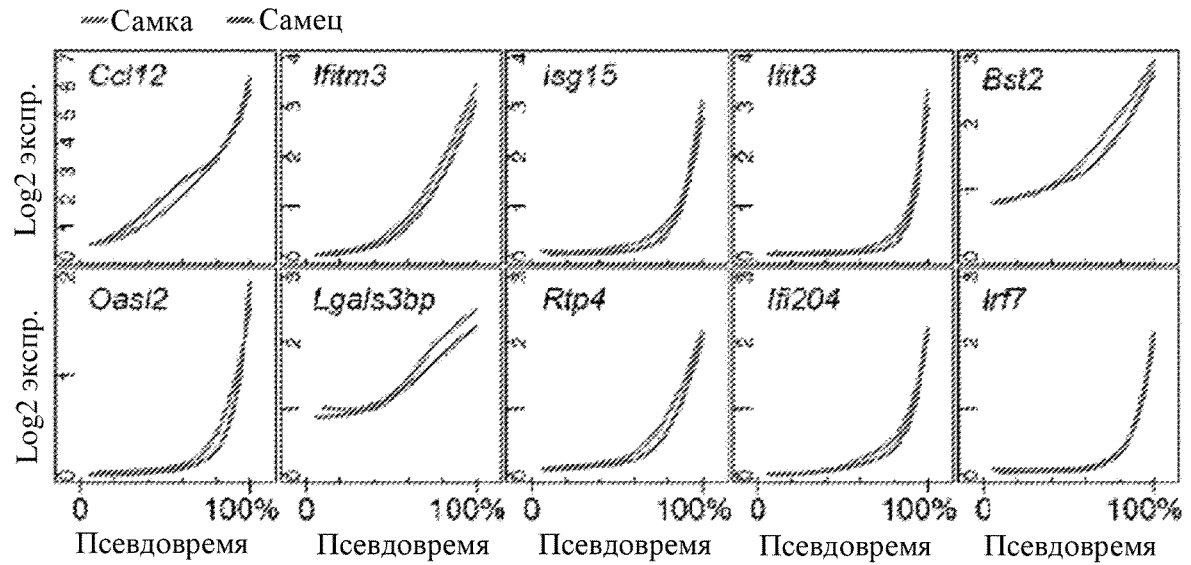
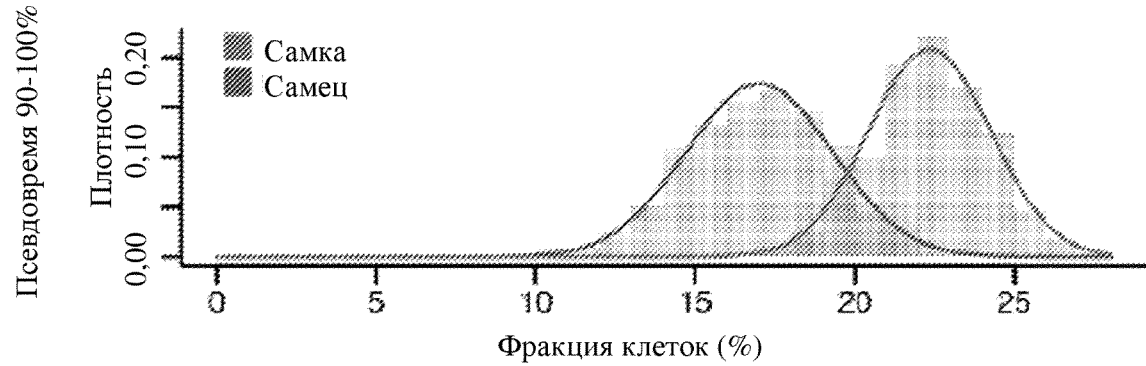
A**Траектория DAM****Фиг. S4A**

B

Траектория Суc-М

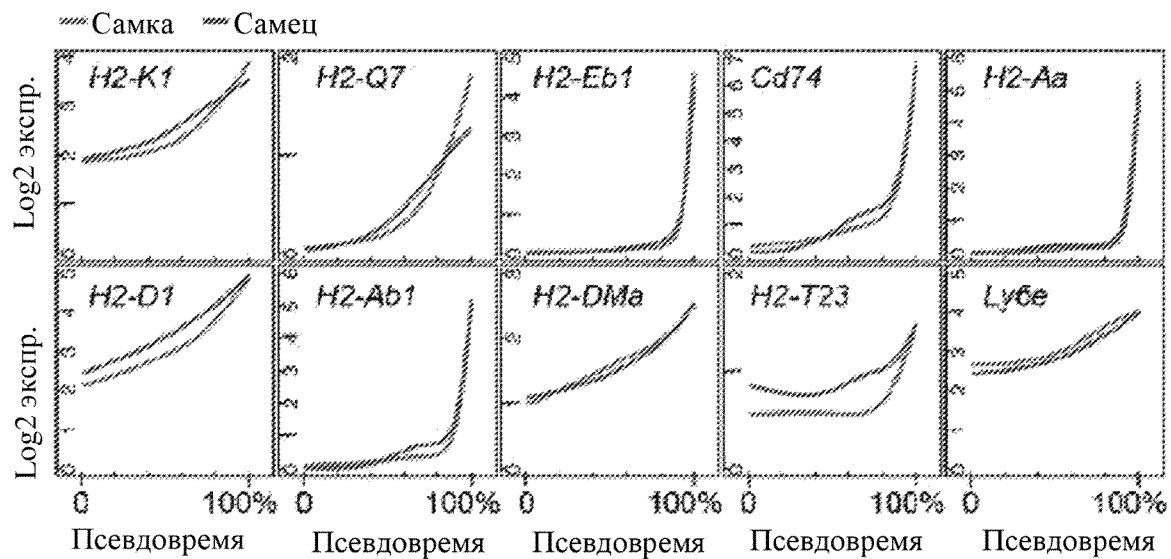


Фиг. S4B

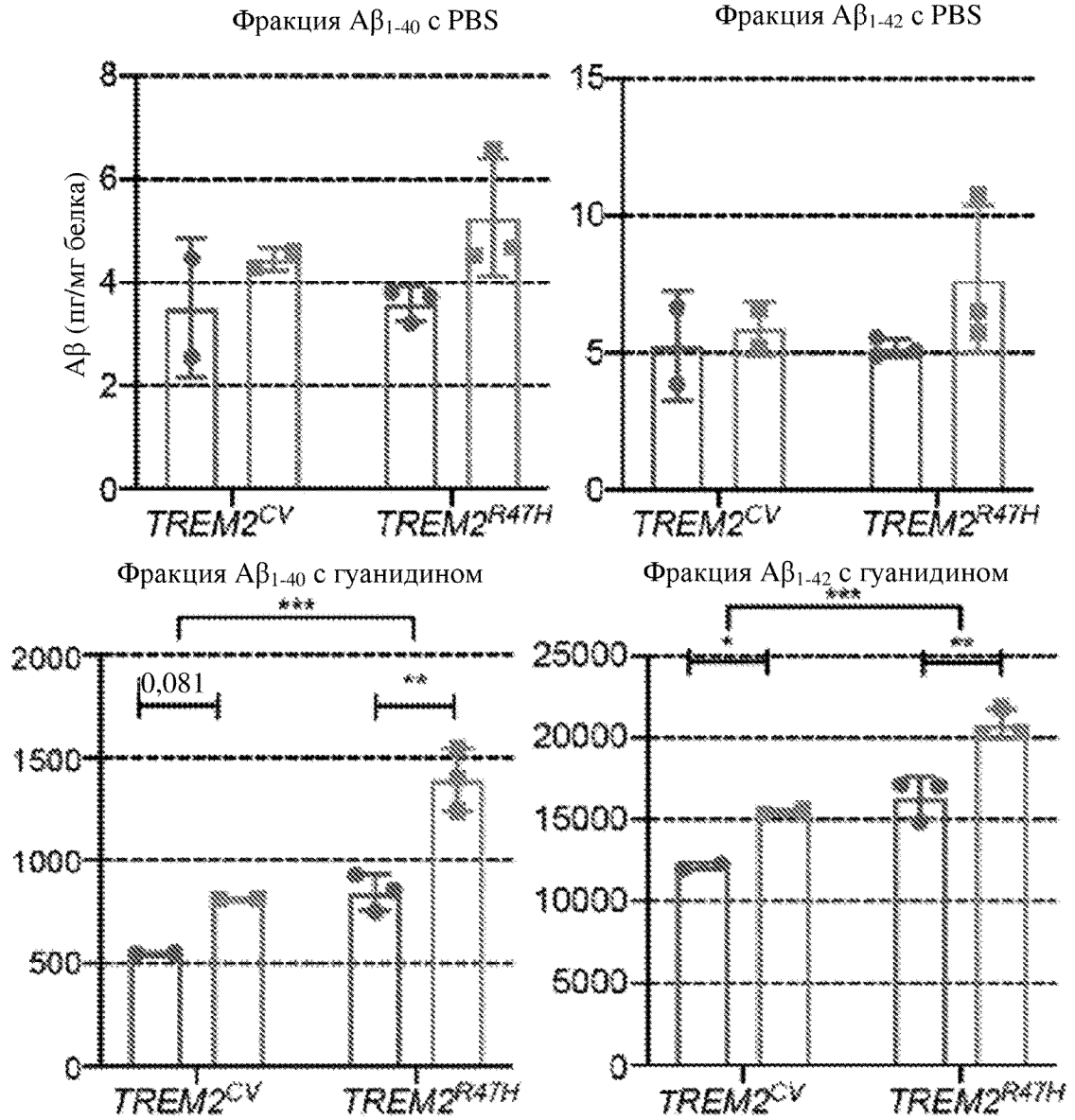
C**Траектория IFN-R****Фиг. S4C**

D

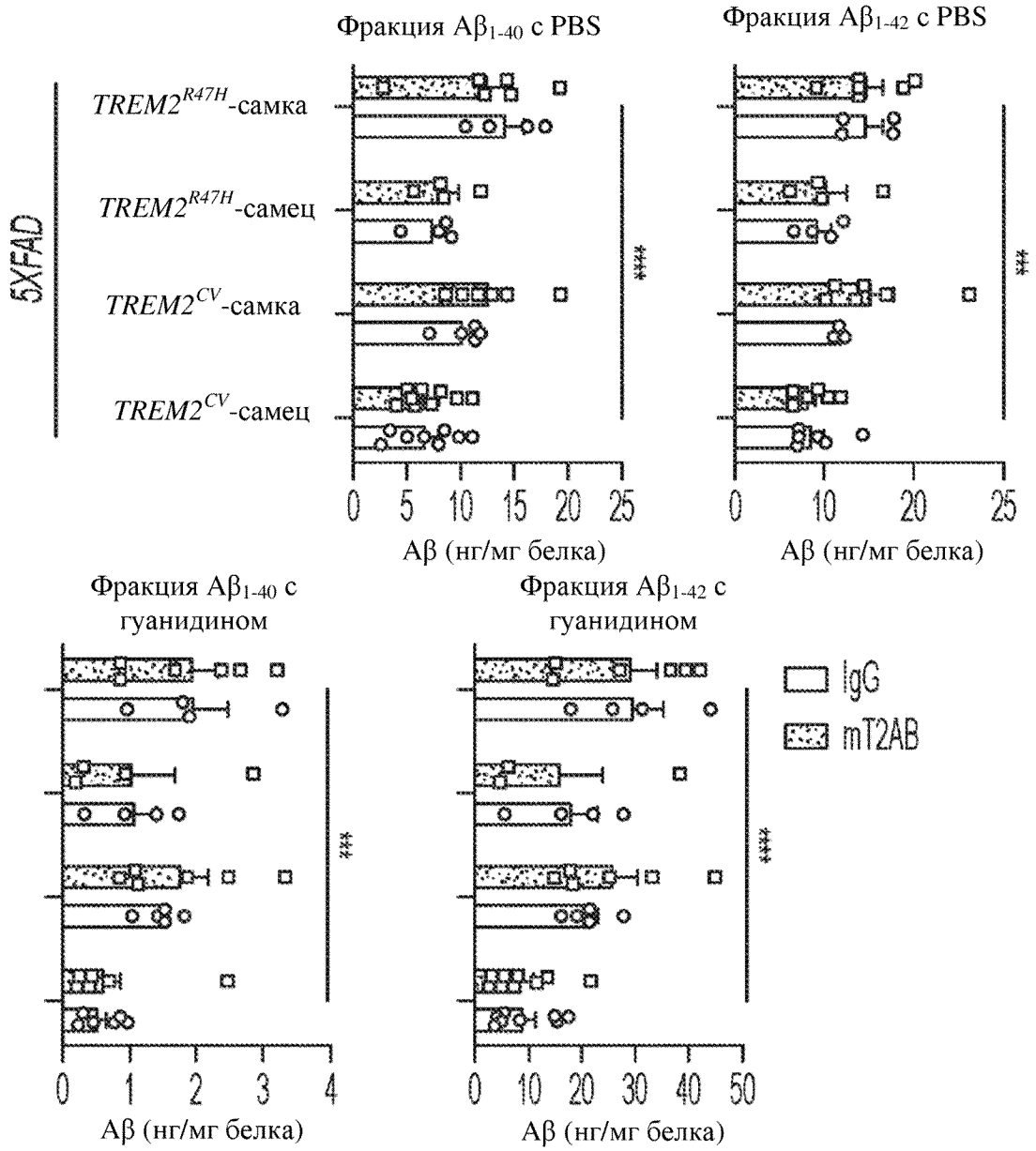
Траектория МНС-II



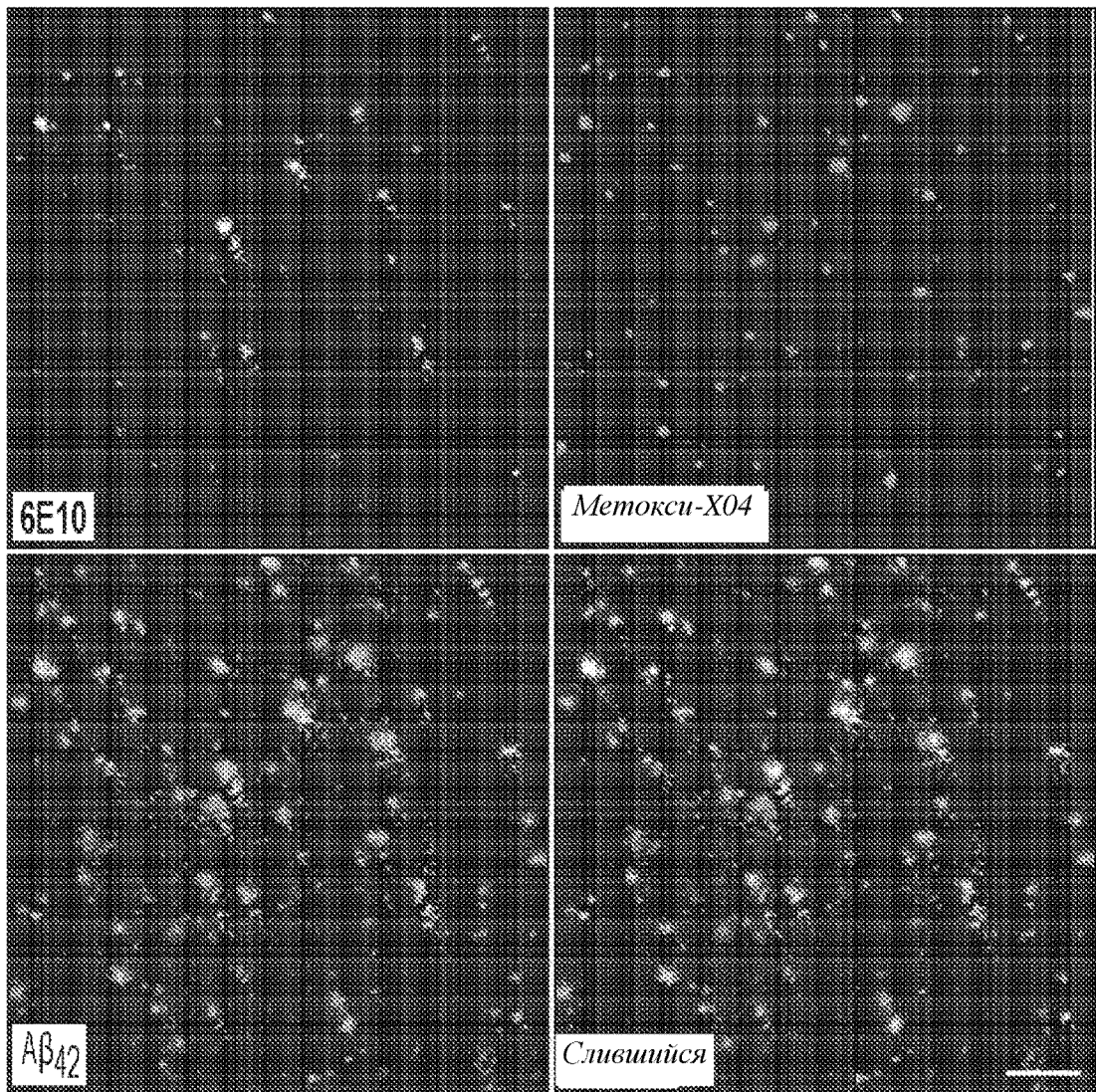
Фиг. S4D



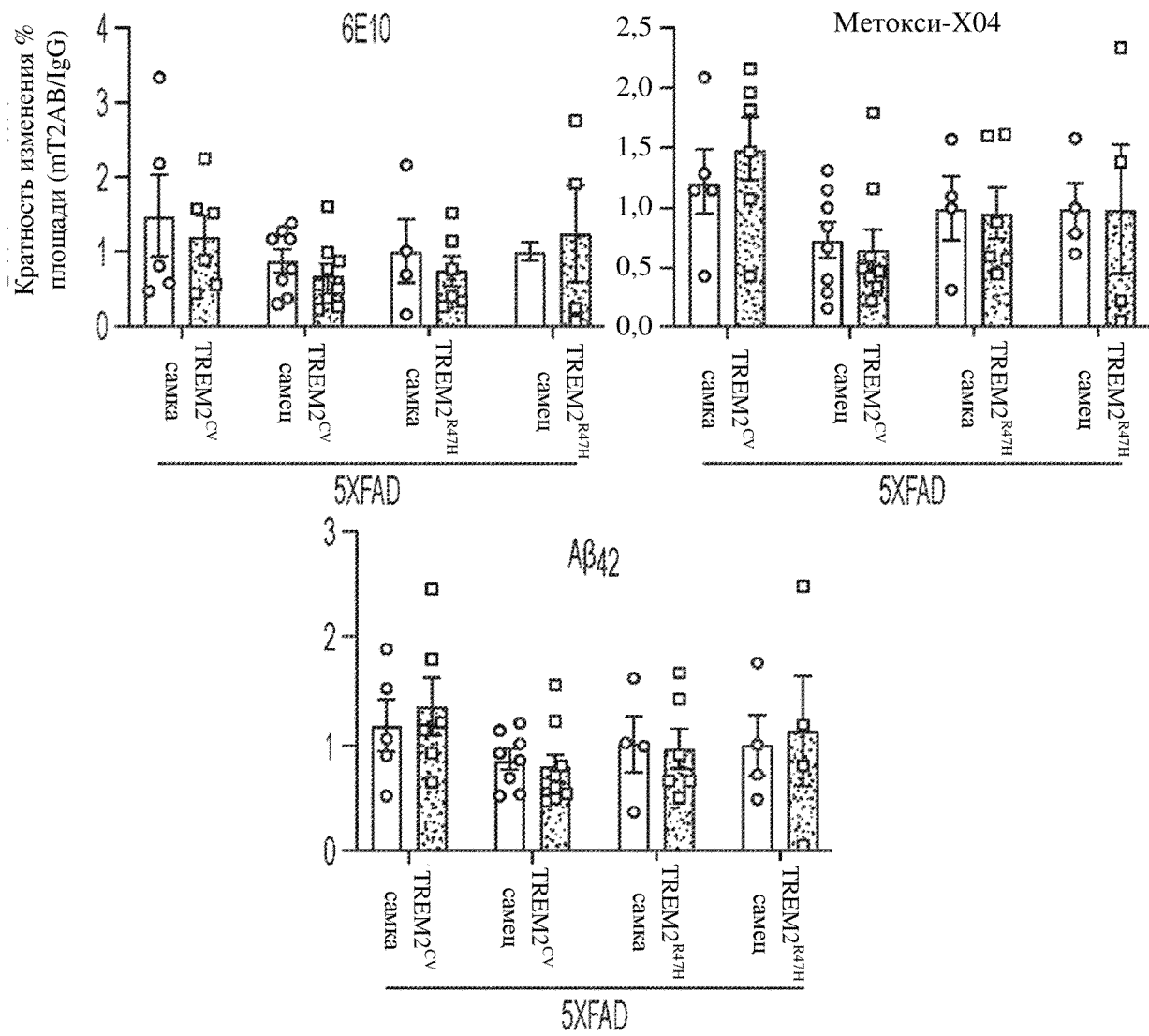
Фиг. S4E



Фиг. S5A



Фиг. S5b



Фиг. S5C