(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118909116 A
(43)申请公布日 2024.11.08

(21)申请号 202411023066.2
(22)申请日 2019.10.15
(30)优先权数据
62/745,798 2018.10.15 US
62/835,289 2019.04.17 US
62/890,665 2019.08.23 US
62/892,517 2019.08.27 US
(62)分案原申请数据
201980067668.9 2019.10.15
(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士
(72)发明人 V·布兰德 D·费尔巴哈
F·加斯帕里尼 N·乔治
E·沙特 D·席姆谢克
H·斯里尼瓦 M·沃尔德胡伯
R·维肯
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 黄革生 隋晓平
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

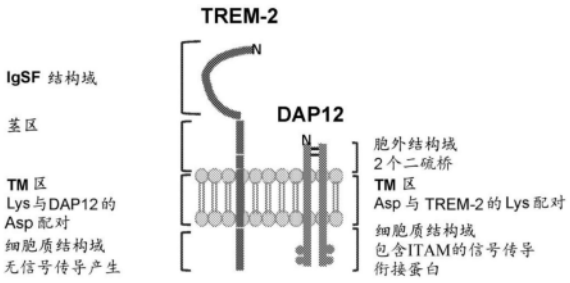
权利要求书14页 说明书168页
序列表（电子公布） 附图23页

(54)发明名称

稳定TREM2的抗体

(57)摘要

本发明提供结合并稳定在人髓系细胞触发受体2(TREM2)蛋白的抗体和使用这些抗体的方法。



CN 118909116 A

1.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与人髓系细胞触发受体2(hTREM2)蛋白的免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域结合并稳定hTREM2蛋白(例如,SEQ ID NO:1、2或3)。

2.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46、R47、H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75、R77、D87、T88、L89和G90。

3.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的一个或多个选自由以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,一个或多个选自由以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,以及一个或多个选自由以下组成的组的残基:D87、T88、L89和G90。

4.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的五个或更多个选自由以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,四个或更多个选自由以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,以及三个或更多个选自由以下组成的组的残基:D87、T88、L89和G90。

5.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的七个或更多个选自由以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,四个或更多个选自由以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,以及三个或更多个选自由以下组成的组的残基:D87、T88、L89和G90。

6.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的五个或更多个选自由以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,所有残基H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,以及三个或更多个选自由以下组成的组的残基:D87、T88、L89和G90。

7.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

8.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

9.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

10.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合四个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

11.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合五个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

12.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合六个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、

F74、T88和L89。

13.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合七个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

14.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合八个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

15.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合九个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

16.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

17.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和G90。

18.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和G90。

19.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和G90。

20.如权利要求7至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基D39、K42、R46和G90。

21.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88、L89、D39、K42、R46和G90。

22.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

23.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

24.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

25.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合四个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

26.如权利要求7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合五个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

27.如权利要求7至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合六个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、

L75、R77和D87。

28.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88、L89、R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

29.如权利要求1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段活化hTREM2。

30.如权利要求1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段促进表达TREM2的细胞中的一种或多种hTREM2依赖性生理活性。

31.如权利要求1至30中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段:

a)增加吞噬作用,例如在表达hTREM2的细胞中增加吞噬作用,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2A巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞样细胞,

b)增加趋化性,例如在表达hTREM2的细胞中增加趋化性,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2a巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞样细胞,

c)增加人单核细胞系中NFAT驱动的报告基因活性,

d)增加Syk磷酸化,例如在表达hTREM2的细胞中增加Syk磷酸化,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2A巨噬细胞,或

e)增加a)至d)中两项或更多项的任何组合。

32.如权利要求1至31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过FACS分析对hM2a巨噬细胞所测量,该抗体或其抗原结合片段以1nM或更低的半最大有效浓度(EC_{50})结合hTREM2,例如结合细胞表面上的hTREM2。

33.如权利要求1至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过FACS分析对hM2a巨噬细胞所测量,该抗体或其抗原结合片段以0.59nM或更低的半最大有效浓度(EC_{50})结合hTREM2,例如结合细胞表面上的hTREM2。

34.如权利要求1至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过表面等离子体共振(SPR)测量,该抗体或其抗原结合片段以150pM或更低的解离常数(K_D)结合hTREM2。

35.如权利要求1至34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过表面等离子体共振(SPR)测量,该抗体或其抗原结合片段以50pM或更低的解离常数(K_D)结合hTREM2。

36.如权利要求1至35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段使表达hTREM2的细胞的细胞表面上的hTREM2蛋白稳定。

37.如权利要求36所述的抗体或其抗原结合片段,其中该表达hTREM2的细胞是巨噬细胞,例如M2a巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞。

38.如权利要求1至37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段在hM2A巨噬细胞中以100nM或更低的浓度减少hTREM2蛋白的胞外域的脱落。

39.如权利要求1至38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中TREM2细胞表面表达增加3倍或更高。

40.如权利要求1至39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中hTREM2的IgSF结构

域包含SEQ ID NO 1、2和3中任一个的氨基酸残基19至132。

41.如权利要求1至40中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:46,或SEQ ID NO:48;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:49;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:60;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:58;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:59;

b)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:22;

c)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79;或

d)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:91;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:92;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:103;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:101;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:102。

42.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2蛋白的IgSF结构域,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:46,或SEQ ID NO:48;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:49;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:60;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:58;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ

ID NO:56或SEQ ID NO:59;

b)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:22;

c)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79;或

d)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:91;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:92;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:103;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:101;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:102。

43.如权利要求1至42中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含

a)与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:50具有至少95%序列同一性的VH多肽序列,和与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:61具有至少95%序列同一性的VL多肽序列;或

b)与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:93具有至少95%序列同一性的VH多肽序列,和与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:104具有至少95%序列同一性的VL多肽序列。

44.如权利要求1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:7,例如由SEQ ID NO:7组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:44,例如由SEQ ID NO:44组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:42,例如由SEQ ID NO:42组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:54,例如由SEQ ID NO:54组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:55,例如由SEQ ID NO:55组成;以及轻链可

变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:7,例如由SEQ ID NO:7组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:87,例如由SEQ ID NO:87组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:85,例如由SEQ ID NO:85组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:97,例如由SEQ ID NO:97组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:98,例如由SEQ ID NO:98组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

45.如权利要求1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

a)SEQ ID NO:8的重链可变区CDR1;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:9,例如由SEQ ID NO:9组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:20,例如由SEQ ID NO:20组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:22,例如由SEQ ID NO:22组成;

b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:45,例如由SEQ ID NO:45组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:46,例如由SEQ ID NO:46组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:57,例如由SEQ ID NO:57组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:58,例如由SEQ ID NO:58组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:59,例如由SEQ ID NO:59组成;

c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:8,例如由SEQ ID NO:8组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:9,例如由SEQ ID NO:9组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:20,例如由SEQ ID NO:20组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:79,例如由SEQ ID NO:79组成;或

d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:88,例如由SEQ ID NO:88组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:89,例如由SEQ ID NO:89组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:100,例如由SEQ ID NO:100组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:101,例如由SEQ ID NO:101组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:102,例如由SEQ ID NO:102组成。

46.如权利要求1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:10,例如由SEQ ID NO:10组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:11,例如由SEQ ID NO:11组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:12,例如由SEQ ID NO:12组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:23,例如由SEQ ID NO:23组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可

变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:47,例如由SEQ ID NO:47组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:48,例如由SEQ ID NO:48组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:49,例如由SEQ ID NO:49组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:60,例如由SEQ ID NO:60组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:58,例如由SEQ ID NO:58组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:10,例如由SEQ ID NO:10组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:11,例如由SEQ ID NO:11组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:12,例如由SEQ ID NO:12组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:23,例如由SEQ ID NO:23组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:90,例如由SEQ ID NO:90组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:91,例如由SEQ ID NO:91组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:92,例如由SEQ ID NO:92组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:103,例如由SEQ ID NO:103组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:101,例如由SEQ ID NO:101组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

47.如权利要求1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:4,例如由SEQ ID NO:4组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:41,例如由SEQ ID NO:41组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:42,例如由SEQ ID NO:42组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:54,例如由SEQ ID NO:54组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:55,例如由SEQ ID NO:55组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:4,例如由SEQ ID NO:4组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:84,例如由SEQ ID NO:84组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:85,例如由SEQ ID NO:85组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:97,例如由SEQ ID NO:97组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:98,例如由SEQ ID NO:98组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

48.如权利要求1-47中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结

合片段包含:

a)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:13,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:24,例如由其组成;或

b)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:50,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:61,例如由其组成;或

c)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:24具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

d)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:50具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:61具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

e)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:24差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;或

f)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:50差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:61差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;

g)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:13,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:80,例如由其组成;或

h)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:93,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:104,例如由其组成;或

i)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:80具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

j)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:93具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:104具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

k)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:80差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;或

l)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:93差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:104差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成。

49.如权利要求1-48中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、或SEQ ID NO:39,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

b)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

c)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:39具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:26具有至少95%序列同一性;

d)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:76具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有至少95%序列同一性;

e)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:82,例如由其组成;

f)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:95,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:106,例如由其组成;

g)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:15具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:82具有至少95%序列同一性;或

h)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:95具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:106具有至少95%序列同一性。

50.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与人髓系细胞触发受体2(hTREM2)的免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域结合,该抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

b)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:29,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

c)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:33,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

d)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:35,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

e)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:37,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

f)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:39,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

g)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:52,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

h)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:66,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

i)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:70,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

j)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:72,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

k)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:74,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

l)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:76,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

m)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:82,例如由其组成;或

n)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:95,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:106,例如由其组成。

51.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与如权利要求1-50中任一

项所述的任何抗体或其抗原结合片段竞争结合hTREM2蛋白。

52.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段结合与如权利要求1-51中任一项所述的任何抗体或其抗原结合片段的表位重叠的表位。

53.如权利要求1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

54.如权利要求1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含Fc区,该Fc区选自IgG1 Fc区、IgG2 Fc区、IgG4 Fc区、或IgG2/IgG4杂合Fc区。

55.如权利要求1-49或51-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含修饰的Fc区,该修饰的Fc区相比于亲本抗体具有降低的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。

56.如权利要求1-55中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段是人或人源化抗体或其片段。

57.如权利要求1-56中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与另一个部分缀合。

58.如权利要求1-57中任一项所述的抗体,其中所述抗体属于IgG1同种型。

59.如权利要求1-56中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人或人源化抗体。

60.如权利要求1-57中任一项的抗体的抗原结合片段,其中该抗原结合片段选自Fab、F(ab')2、Fv片段、scFv、微抗体或双抗体。

61.如权利要求1-60中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆的。

62.如权利要求1-61中任一项所述的抗体,其中该抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

63.如权利要求62所述的抗体,其中该多特异性抗体,例如双特异性抗体,特异性结合hTREM2和人DAP12(12kDa的DNAX活化蛋白)。

64.如权利要求1-63中任一项所述的抗体,其中所述抗体通过该Fc区的突变而具有改变的效应子功能。

65.一种核酸分子或核酸分子组,该核酸分子或核酸分子组编码如权利要求1至64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种。

66.如权利要求65所述的核酸分子,其中该核酸是DNA。

67.如权利要求65或66所述的核酸分子或核酸分子组,该核酸分子或核酸分子组包含SEQ ID NO:14、28、51、65、16、30、34、36、38、40、53、67、71、73、75、77、25、31、62、68、27、32、64、69、13、93、15、95、80、104、82或106中的一个或多个。

68.一种载体,该载体包含如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子。

69.如权利要求68所述的载体,其中该载体是克隆载体或表达载体。

70.如权利要求68或69所述的载体,其中所述载体包含SEQ ID NO:14、28、51、65、16、30、34、36、38、40、53、67、71、73、75、77、25、31、62、68、27、32、64、69、13、93、15、95、80、104、82或106中的一个或多个,或其编码至少一个CDR区的片段。

71.如权利要求68-70中任一项所述的载体,其中该载体能够在原核细胞和/或真核细胞中复制。

72.如权利要求68-71中任一项所述的载体,其中该载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、粘粒或病毒载体。

73.如权利要求68-72中任一项所述的载体,其还包含可检测的和/或可选择的标志物。

74.具有两个如权利要求68-73中任一项所述的表达载体的组,一个载体编码a)包含SEQ ID NO:13或50的至少一个VH结构域,并且另一个载体编码包含SEQ ID NO:24或61的至少一个VL结构域;或

b)包含SEQ ID NO:13或93的至少一个VH结构域,并且另一个载体编码包含SEQ ID NO:80或104的至少一个VL结构域。

75.如权利要求68-74中任一项所述的载体,其中该载体是病毒载体,任选其中该病毒载体是慢病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、细小病毒、逆转录酶病毒、牛痘病毒、辛德毕斯病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒(NDV)、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、塞内卡谷病毒、柯萨奇病毒、肠病毒、粘液瘤病毒或马拉巴病毒。

76.如权利要求75所述的载体,其中该载体是AAV载体。

77.如权利要求68-76中任一项所述的载体,其中该载体还包含启动子。

78.如权利要求68-77中任一项所述的载体,其中该载体包含AAV9衣壳和AAV载体质粒,该AAV载体质粒包含(1)衍生自AAV2的ITR,(2)CMV增强子(例如,包含SEQ ID NO:134),(3)CBA启动子(例如,包含SEQ ID NO:135),(4)SV40内含子(例如,包含SEQ ID NO:137),(5)编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸,和(6)BGH聚A信号(例如,包含SEQ ID NO:138)。

79.如权利要求78所述的载体,其中元件(2)至(6)从5'至3'布置在该AAV载体质粒上。

80.如权利要求78或79所述的载体,其中元件(2)至(6)中的任一个布置在该AAV载体质粒上的5'ITR和3'ITR之间。

81.如权利要求78-80中任一项所述的载体,其中该AAV载体是scAAV载体。

82.如权利要求68-75中任一项所述的载体,其中该载体是慢病毒载体。

83.一种细胞,其包含如权利要求64-66中任一项所述的核酸分子或核酸分子组或如权利要求68-82中任一项所述的载体。

84.一种产生hTREM2抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括:(i)培养如权利要求83所述的细胞和(ii)从培养物中分离该hTREM2抗体或其抗原结合片段。

85.一种药物组合物,其包含如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体或如权利要求83所述的细胞,和药学上可接受的载体。

86.如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物,其用作药物。

87.如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物,其用于治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病。

88.如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一

项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病。

89.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该疾病是神经炎症或神经退行性疾病,任选地,其中该神经炎症或神经退行性疾病是阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、尼曼-皮克病、黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。

90.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该疾病是阿尔茨海默病。

91.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该疾病是帕金森病。

92.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该疾病是多发性硬化。

93.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该疾病是额颞叶痴呆。

94.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用受试者。

95.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中将该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物与至少一种另外的治疗剂或治疗程序组合施用受试者。

96.如权利要求87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如权利要求88所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物与至少一种另外的治疗剂组合地施用受试者,其中所述治疗剂包含以下中的一种或多种:BACE抑制剂、抗Tau抗体、Tau反义寡核苷酸、抗淀粉样β抗体、芬戈莫德、BG12或富马酸二甲酯、干扰素β或那他珠单抗。

97.一种在有需要的受试者中治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物。

98.如权利要求97所述的方法,其中该方法包括:

a)测定从受试者获得的样品中的细胞表面hTREM2水平;

b)选择细胞表面hTREM2水平低于参考水平的受试者,其中该参考水平是从健康受试者获得的样品中的细胞表面hTREM2水平;以及

c)向所选受试者施用治疗有效量的如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物。

99.如权利要求98所述的方法,其中该样品包含脑脊液。

100.如权利要求98或99所述的方法,其中所述样品中的细胞表面TREM2水平通过选自以下的测定来确定:流式细胞术、免疫组织化学、蛋白质印迹、免疫荧光测定、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、均相时间分辨荧光(HTRF)、或正电子发射断层扫描(PET)。

101.如权利要求97-100中任一项所述的方法,其中该与TREM2功能丧失相关的疾病是神经炎症或神经退行性疾病,任选地,其中该神经炎症或神经退行性疾病是阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、尼曼-皮克病、黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。

102.如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是阿尔茨海默病。

103.如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是帕金森病。

104.如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是多发性硬化。

105.如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是额颞叶痴呆。

106.如权利要求97-105中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用该受试者。

107.一种稳定受试者中的hTREM2蛋白的方法,该方法包括以有效稳定hTREM2的量向该受试者施用如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物。

108.如权利要求97-107中任一项所述的方法,该方法还包括向该受试者施用至少一种另外的治疗剂或进行至少一种另外的治疗程序。

109.如权利要求108所述的方法,其中所述另外的治疗剂包含以下中的一种或多种:BACE抑制剂、抗Tau抗体、Tau反义寡核苷酸、抗淀粉样β抗体、芬戈莫德、BG12或富马酸二甲酯、干扰素β或那他珠单抗。

110.如权利要求108或109所述的方法,其中如权利要求1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如权利要求68-82中任一项所述的载体、如权利要求83所述的细胞或如权利要求85所述的药物组合物与该另外的治疗剂同时、在该另外的治疗剂之前或在该另外的治疗剂之后施用。

111.如权利要求97-110中任一项所述的方法,其中施用该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物具有以下效果a-d中的一种或多种:

a)增加TREM2依赖性细胞活性,如吞噬作用和趋化性,

b)触发TREM2依赖性基因转录,

c)增加经由Syk-磷酸化的TREM2依赖性细胞内信号传导途径,

d)增加细胞碎片的清除。

稳定TREM2的抗体

[0001] 本申请是申请日为2019年10月15日、发明名称为“稳定TREM2的抗体”的中国专利申请201980067668.9(国际申请号PCT/IB2019/058769)的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2019年9月16日,名为PAT058251_ST25,大小为147,551字节。

技术领域

[0004] 本发明提供结合并稳定在人髓系细胞触发受体2(TREM2)蛋白的抗体和使用这些抗体的方法。

背景技术

[0005] 髓系细胞触发受体或“TREM”上是一组跨膜糖蛋白,其在不同类型的骨髓细胞上表达,例如巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯(Langerhans)细胞、库普弗(Kupffer)细胞和中性粒细胞(Takaki,R.等人,Immunol.Rev.[免疫学评论],2006,214:118-29)。TREM在其细胞外结构域中具有免疫球蛋白(Ig)型折叠,因此属于免疫球蛋白超家族(IgSF)。TREM受体含有短的细胞内结构域,但缺少用于信号传导介质的对接基序,并且需要衔接蛋白,例如DAP12(12kDa的DNAX活化蛋白)用于细胞活化。已报道两个TREM成员:TREM1和TREM2,两者都在免疫和炎症应答中起重要作用。编码人TREM的基因定位于染色体6p21.1,染色体6p21.1携带编码TREM1、TREM2、TREM3、TREM4和TREM5的基因簇,以及TREM样基因。

[0006] TREM2是约40kDa的糖蛋白,其在N-去糖基化后降低至26kDa。整个TREM2蛋白由以下组成:前导信号肽(氨基酸1-18)、单个V型IgSF胞外区(氨基酸19-132)、茎区(氨基酸133-172)、带正电荷的跨膜结构域(氨基酸173-197)和胞质尾(氨基酸198-230)(Kober等人,Elife 5(2016);Kober等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]429(2017)1607-1629.)。由外显子2编码的细胞外区域由单一类型的V IgSF结构域(其含有三个潜在的N-糖基化位点)构成。推定的跨膜区含有带电荷的赖氨酸残基。TREM2的细胞质尾缺乏信号基序,并且被认为通过信号传导衔接子分子DAP12/TRYROBP发出信号。

[0007] TREM2与DAP12物理缔合,DAP12充当TREM2和许多其他细胞表面受体的信号传导衔接子蛋白。DAP12的细胞质结构域含有免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)(Wunderlich,J.Biol.Chem[生物化学杂志].288,33027-33036,2013)。相互作用受体活化后,DAP12通过Src激酶在保守性ITAM酪氨酸残基上经历磷酸化。随后的Syk蛋白激酶的募集和活化触发下游信号传导途径,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PI3K、NFκB和磷脂酶Cγ(PLCγ)的活化。

[0008] TREM2可以被以下活化:脂多糖(LPS),热休克蛋白60,神经碎片,细菌,载脂蛋白E和各种阴离子和两性离子脂质,例如磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)、心磷脂和鞘磷脂。TREM2活化增加小胶质细胞和巨噬细胞

的吞噬能力,减少促炎细胞因子的释放并限制TLR信号传导。TREM2通过与CSF-1受体信号传导协同维持小胶质细胞存活。此外,TREM2与调节细胞粘附和运动的从蛋白-A1相互作用。TREM2还富集在接触Aβ斑块或神经元碎片的那些小胶质细胞表面区域(Yuan等人,Neuron[神经元]90(2016)724-739)。最近已经鉴定了在这种环境中由TREM2感知的一些配体,例如磷脂和髓磷脂(Poliani等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志]125(2015):2161-2170)以及ApoE(Atagi等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]290(2015):26043-26050;Bailey等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]290(2015):26033-26042)。其他配体可以是Aβ和斑块相关的神经元碎片,因为TREM2有助于将Aβ摄取到小胶质细胞中(Xiang等人,EMBO Mol.Med.[欧洲分子生物学学会杂志之分子医学]8(2016):992-1004)。TREM2还被证明在清除凋亡细胞(Takahashi等人,J.Exp.Med.201(2005),647-657)、髓鞘碎片(Poliani等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志]125(2015):2161-2170)和细菌珠(Cen等人,Am.J.Respir.[美国呼吸学杂志].188(2013)201-212)中起作用。TREM2信号传导促进摄入的捕获物的降解,并且对于脂质代谢、髓磷脂摄取和细胞内分解是至关重要的。

[0009] TREM2通过胞外域脱落和膜内蛋白水解进行顺序蛋白水解加工(Wunderlich,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]288,33027-33036,2013)。在胞外域脱落期间,TREM2的胞外域由蛋白酶释放,所述蛋白酶是例如ADAM成员(含有解整联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白质)或BACE(β-位点APP切割酶)家族(Kleinberger,Sci.Transl.Med.[科学转化医学]2014;6(243):243ra86)。

[0010] 去除胞外域后,通过γ-分泌酶介导的膜内蛋白水解进一步处理剩余的膜保留片段。已经在树突细胞培养物的上清液以及来自患有非炎性神经疾病和多发性硬化的患者的血浆和CSF(脑脊液)样品中观察到由胞外域脱落产生的TREM2的可溶性片段(sTREM2)(Kleinberger,2014)。人CSF中TREM2即sTREM2的脱落的胞外域已经被评估为潜在的阿尔茨海默病(AD)生物标志物,并且已经显示在一般的衰老过程中增加(Suarez-Calvet,EMBO Mol.Med.[欧洲分子生物学学会杂志之分子医学]8,466-476,2016)。在AD过程中的详细分析显示,在AD痴呆中,sTREM2在临床症状出现之前在AD早期增加,在MCI-AD中达到峰值,并且保持升高的但与MCI-AD阶段相比较低的水平(Suarez-Calvet,2016)。

[0011] 疾病高峰期TREM2表达的增加推动了消退(例如腹膜炎,伤口愈合)(Turnbull,2006;Gawish,2015)。在诸如神经炎症的慢性炎症条件下,TREM2不断脱落并且不能在小胶质细胞和巨噬细胞中发挥其信号传导功能。因此,稳定和/或防止TREM2在细胞表面脱落将恢复小胶质细胞和巨噬细胞中功能性的、能够进行信号传导的TREM2表达。

[0012] 人类遗传学研究表明,表面TREM2的缺失而不是缺乏sTREM2会导致疾病风险。例如,TREM2蛋白中位置47的氨基酸从R到H的突变(例如,在SEQ ID NO:1中)导致细胞表面表达略微降低(Kleinberger2014),并且降低TREM2的配体结合能力(Wang 2015,Atagi 2015,Bailey2015)。TREM2中的氨基酸突变T66M导致TREM2在细胞表面缺乏表达(Kleinberger 2014),因此不产生可溶性TREM2。TREM2的切割位点的突变:H157Y增强sTREM2的表达并减少全长膜结合的TREM2,并且与AD风险增加相关(Thornton 2017,Schlepckow 2017)。因此,这些遗传学研究表明,在细胞表面稳定TREM2对于减少sTREM2和增加质膜结合的TREM2都是希望的。

[0013] Haass等人(WO 18015573)产生了抗体,这些抗体结合跨越TREM2茎区的氨基酸

152-161的10个氨基酸的肽段(AHVEHSISRS SEQ ID NO:132)并抑制TREM2切割。此类抗体通过直接结合并且由此封闭切割位点防止TREM2的切割。Schwabe等人(WO 17062672)披露了与TREM2结合的抗体。然而,任何披露的抗体都没有表明稳定作用。相反,对于WO 17062672中描述的一些抗体,报道了去稳定作用(实例15)。

[0014] 因此,需要鉴定和开发能够稳定TREM2并活化和/或促进或TREM2相关功能的hTREM2抗体,其具有良好的可开发特征并且适合于治疗患有其中TREM2稳定化是有利的神经退行性疾病的患者。

发明内容

[0015] 已发表的文献已针对TREM2的茎区产生抗体,这些抗体稳定TREM2,因为ADAM17的切割位点位于该茎区内。实际上,预期诸如抗体(或其结合片段)的大分子将在空间上阻碍脱落酶进入茎(氨基酸133-172)的相对小区域。因此,先前产生针对TREM2的稳定化抗体的努力已经针对TREM2的茎区并不出人意料。TREM2的IgSF区(SEQ ID NO:1、2或3中任一个的氨基酸19-132)位于远离切割位点(H157)并且是胞外域的一部分。到目前为止,IgSF区还没有被认为是稳定TREM2的抗体的潜在靶标,因为预期针对TREM2的IgSF区的抗体不会在空间上阻碍脱落酶进入TREM2切割位点。

[0016] 出人意料的是,我们发现本文披露的抗体与IgSF区结合并且能够有效地稳定细胞表面上的TREM2。我们还显示这种抗体能够显示功能性下游效应,例如促进人M2A巨噬细胞中TREM2依赖性吞噬作用。此外,此类抗体还可以增强体内TREM2依赖性功能,例如通过增加脑中小胶质细胞或巨噬细胞的吞噬能力。

[0017] 因此,本文提供了抗体或其抗原结合片段,例如单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人TREM2(hTREM2)的IgSF结构域并稳定hTREM2蛋白。这种抗体在本文中称为“hTREM2抗体或其抗原结合片段”。这些hTREM2抗体或其抗原结合片段可以(i)减少或抑制TREM2胞外域的脱落;(ii)稳定细胞表面的TREM2蛋白;和/或(iii)维持或增加TREM2功能,例如与其同源配体结合、细胞内信号传导、增加吞噬作用、促进吞噬物质的降解、以及促进TREM2依赖性下游调节功能。由于功能失调的TREM2或缺乏表面TREM2与人神经炎症和神经退行性病理相关,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断神经炎症或神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉(Nasu-Hakola)病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、如尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病(Neuro-Behcet's Disease)、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段也适用于治疗、预防或诊断由TREM2的广泛蛋白水解切割或表达TREM2受体的异常或突变变体的细胞介导的或与其相关的自身免疫性障碍、炎性障碍或恶性障碍。在一些优选的实施例中,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断选自阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病的疾病。

本文还提供了使用本文披露的TREM2结合抗体或抗原结合片段诊断和/或治疗TREM2相关疾病的方法。

[0018] 在一个方面,本文提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域并稳定TREM2蛋白。在一些优选的实施例中,这些抗体或其抗原结合片段使表达TREM2的细胞(例如巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞)的细胞表面上的TREM2蛋白稳定。在一些实施例中,这些抗体或其抗原结合片段减少TREM2蛋白的胞外域的蛋白水解脱落。

[0019] 在一些实施例中,本文提供了特异性结合人TREM2的IgSF结构域的抗体或其抗原结合片段。例如,此类抗体或其抗原结合片段结合人TREM2的IgSF结构域,该IgSF结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基19至132,SEQ ID NO:2的氨基酸残基19至132,或SEQ ID NO:3的氨基酸残基19至132。在一些实施例中,TREM2抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中,抗原结合片段是Fab、$F(ab')_2$、Fv片段、scFv、微抗体(minibody)或双抗体(diabody)。

[0020] 在一些实施例中,TREM2抗体是双特异性抗体。在一些实施例中,双特异性抗体特异性结合人TREM2和DAP12。

[0021] 在一些实施例中,TREM2抗体包含Fc区。在一些实施例中,Fc区是修饰的IgG1 Fc区,其与亲本抗体相比时具有一个或多个突变并且具有降低的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。在一些实施例中,Fc区选自IgG2 Fc区,IgG4 Fc区或IgG2/IgG4杂合Fc区。

[0022] 在一些实施例中,hTREM2抗体或其抗原结合片段是单克隆的。本文提供了编码此类单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸,以及包含编码此类单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸的载体和宿主细胞。

[0023] 另一方面,本文提供药物组合物,其包含一种或多种本文所述的TREM2抗体或其抗原结合片段,或编码此类抗体或抗原结合片段的核酸,或包含此类核酸的细胞,和药学上可接受的载体。

[0024] 另一方面,本文提供了通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的任何TREM2抗体或其抗原结合片段来治疗有此需要的受试者中的与TREM2功能丧失相关的疾病的方法。这些方法可以包括以下一个或多个步骤:(1)测定从受试者获得的样品中的细胞表面TREM2水平;(2)选择细胞表面TREM2水平低于参考水平的受试者,其中参考水平是从健康受试者获得的样品中的细胞表面TREM2水平;和(3)给受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域并稳定TREM2蛋白。在一些实施例中,这些方法还包括向受试者施用第二药剂。样品中的细胞表面TREM2水平可以通过选自以下的测定来确定:流式细胞术、免疫组织化学、蛋白质印迹、免疫荧光测定、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、均相时间分辨荧光(HTRF)、或正电子发射断层扫描(PET)。在一些实施例中,样品包含脑脊液及其细胞组分。在一些实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病是神经炎症或神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体

贮积病、如尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。在一些优选的实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病是选自阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病的神经退行性疾病。在进一步优选的实施例中,该疾病是阿尔茨海默病。在一些实施例中,TREM2抗体或其抗原结合片段使表达TREM2的细胞(选自巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞)的细胞表面上的TREM2蛋白稳定。在一些实施例中,TREM2抗体或其抗原结合片段通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用受试者。

[0025] 另一方面,本文提供TREM2抗体或其抗原结合片段,其用于治疗与TREM2功能丧失相关的疾病。在一些优选的实施例中,这些抗体或其抗原结合片段特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域(即SEQ ID NO:1的氨基酸残基19至132,SEQ ID NO:2的氨基酸残基19至132,或SEQ ID NO:3的氨基酸残基19至132)并稳定TREM2蛋白。在一些优选的实施例中,这些抗体或其抗原结合片段使表达TREM2的细胞(选自巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞)的细胞表面上的TREM2蛋白稳定。在一些实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病是神经炎症或神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、如尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。在一些优选的实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病是选自阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病的神经退行性疾病。在进一步优选的实施例中,该疾病是阿尔茨海默病。在一些实施例中,TREM2抗体或其抗原结合片段使表达TREM2的细胞(选自巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞)的细胞表面上的TREM2蛋白稳定。

附图说明

[0026] 图1A显示人TREM2同种型1(SEQ ID NO:1)、同种型2(SEQ ID NO:2)和同种型3(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的示例性比对。

[0027] 图1B说明了TREM2的结构及其与信号传导衔接子蛋白DAP12的相互作用。成熟TREM2包括单个免疫球蛋白(IgSF)结构域、茎区、跨膜(TM)结构域和细胞质结构域。

[0028] 图2显示通过抗体处理在CHO-hDAP12-hTREM2细胞中稳定TREM2。

[0029] 图3显示在用PMA处理之前和之后TREM2抗体与人M2A巨噬细胞的结合。

[0030] 图4显示抗体与在CHO-hDAP12细胞(4B,C)中重组表达的WT-TREM2(4A)和TREM2-

TREM1嵌合蛋白的结合。

[0031] 图5显示TREM2抗体在hM2A的细胞表面稳定TREM2。

[0032] 图6(A,B)显示在细胞表面稳定TREM2的抗体还增加人M2A的吞噬能力。使用学生T检验计算统计学,与同种型对照相比,*Pval<0.05、**Pval<0.01、***Pval<0.001。

[0033] 图7(A,B)显示了hM2A中吞噬作用测定中最低有效剂量的确定。使用学生T检验计算统计学,与同种型对照相比,*Pval<0.05、**Pval<0.01、***Pval<0.001。

[0034] 图8显示板结合的TREM2抗体诱导TREM2依赖性NFAT启动子依赖性基因转录。

[0035] 图9(A,B)显示TREM2抗体增加人M2A巨噬细胞中的Syk磷酸化。(B)表示与(A)中所示的蛋白质印迹的总Syk相关的在不同条件下的pSyk的定量。

[0036] 图10显示人M2A巨噬细胞对金黄色葡萄球菌生物颗粒0-3小时的吞噬作用。

[0037] 图11显示人M2A巨噬细胞对SH-SY5Y细胞3-12小时的吞噬作用。

[0038] 图12显示TREM2抗体促进人M2A巨噬细胞的趋化性。

[0039] 图13显示利用凋亡的pHrodo标记的SH-SY5Y细胞和累积的吞噬作用为读数,TREM2抗体促进人iPS衍生的小胶质细胞的吞噬作用。

[0040] 图14显示TREM2抗体促进人iPS衍生的小胶质细胞的趋化性。

[0041] 图15(A-E)显示了在铜宗模型中用TREM2抗体预防/伴随和治疗性治疗的结果。

[0042] 图16显示了人源化TREM2小鼠中MPTP模型的图像分析(A)结果和每组的代表性显微镜照片(B)。

[0043] 图17(A-C)显示在CHO-hDAP12-hTREM2细胞中利用完整IgG MOR041877、MOR41895、MOR042596、MOR044698和MOR03207进行的Fab MOR041877、MOR041895和MOR042596的交叉封闭实验的结果。

[0044] 图18显示用MOR042596处理后hM2A的吞噬能力的增加。

[0045] 图19显示通过X射线晶体学测定的与MOR042596结合的TREM2表位。TREM2的蛋白质主链以卡通图示出,并且距离Fab 5 Å距离内的TREM2残基的侧链显示为棒。Fab重链显示为深灰色表面,并且轻链显示为浅灰色表面。

[0046] 图20显示TREM2-Fab界面的特写视图(参见图19),比较MOR042596(晶体结构)和MOR044698(同源模型)。Fab的5Å内的TREM2残基显示为棒状,并且标记了LCDR3(D39-K42)近端的残基。重链(深灰色,右上)以及轻链(浅灰色,左上)的LCDR1和LCDR2对于两个Fab都是相同的。LCDR3具有若干个共享的关键残基(位置90、93、95),使得两个Fab的LCDR3的主链环构象保持相同。位置89、91、92、94、96有变化,并且在MOR044698中有一个额外的插入(S95a)。整个表位在MOR042596和MOR044698之间是保守的。

[0047] 图21显示通过X射线晶体学测定的与MOR041877结合的TREM2表位。TREM2的蛋白质主链以卡通图示出,并且距离Fab 5 Å距离内的TREM2残基的侧链显示为棒。Fab重链显示为深灰色表面,并且轻链显示为浅灰色表面。

[0048] 图22(A,B)显示了用铜宗和MOR044698-mu或同种型对照抗体处理的hTREM2-KI小鼠的脑皮质,以及作为对照的原初小鼠(针对TREM2和Iba1染色(A))。提供了对hTREM2阳性的标准化的面积的定量分析(B)。

具体实施方式

[0049] 本文提供了抗体及其抗原结合片段,该抗体及其抗原结合片段特异性结合人TREM2的细胞外结构域并稳定TREM2蛋白。那些TREM2抗体及其抗原结合片段可以减少或抑制TREM2胞外域的脱落;可以稳定细胞表面的TREM2蛋白;并且可任选地维持或增加TREM2功能,例如与其同源配体结合、细胞内信号传导、增加吞噬作用以及促进吞噬物质的降解。由于功能失调的TREM2或缺乏表面TREM2与人神经炎症和神经退行性病理相关,本文所述的稳定TREM2的抗体及其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断神经炎症或神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病(如C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick C))和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。本文所述的TREM2结合抗体及其抗原结合片段也适用于治疗、预防或诊断由TREM2的广泛蛋白水解切割或表达TREM2受体的异常或突变变体的细胞介导的或与其相关的自身免疫性障碍、炎性障碍或恶性障碍。在一些优选的实施例中,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断选自阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病的疾病。本文还提供了使用本文披露的TREM2结合抗体和其抗原结合片段诊断和/或治疗TREM2相关疾病的方法。

[0050] TREM2介导细菌和垂死细胞的非炎性吞噬作用并抑制炎症应答。TREM2的纯合性功能丧失导致那须-哈科拉病(多囊性脂膜性骨发育不良伴硬化性白质脑病,“PLOSL”)、或额颞痴呆(FTD)样综合征、以骨囊肿、神经炎症、进行性神经退行和早老性痴呆为特征的疾病。TREM2的杂合性功能缺失突变R47H也是晚发性阿尔茨海默病(AD)的重要危险因素,其具有与载脂蛋白Eε4等位基因类似的效应大小。TREM2在白质、海马和新皮质中发现的小胶质细胞中表达,这与AD脑中报道的病理特征部分地一致,支持TREM2可能参与AD发病机制。除了AD之外,遗传筛查现还已将TREM2中的杂合错义突变鉴定为帕金森病(PD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)和额颞痴呆(FTD)的危险因素(Kleinberger,Sci Transl Med.[科学转化医学]2014年7月2日;6(243):243ra86)。因此,需要功能性TREM2来预防与衰老相关的神经炎症和导致严重认知障碍和痴呆的神经退行性疾病。

[0051] 由于可变剪接,人体中存在三种TREM2同种型,同种型1是最长的同种型。图1A中显示了人TREM2同种型1(SEQ ID NO:1)、人TREM2同种型2(SEQ ID NO:2)和人TREM2同种型3(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的比对。图1B说明了TREM2的结构及其与信号传导衔接子蛋白DAP12的相互作用。

[0052] 定义

[0053] 如在说明书和权利要求书中所用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数提及物,除非上下文清楚地另外指明。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0054] 所有数字标记,例如pH、温度、时间、浓度和分子量(包括范围),都是近似值,其以0.1的增量变化(+)或(-)。应该理解,尽管并不总是明确地说明,但是所有数字标号前面都

有术语“约”。与数值X相关的术语“约”表示例如X±15%,包括该范围内的所有值。还应理解,尽管并非总是明确说明,但本文描述的试剂仅是实例,并且其等效物是本领域已知的。

[0055] 在整个说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,除非另有说明,否则单词“包含(comprise)”和变体例如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”在本文中以其开放式和非限制性的意义使用。

[0056] 当在本文中使用时,“由……组成”不包括在方面、实施例和/或权利要求部分中未指定的任何元素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”不排除不会实质上影响该方面、实施例和/或权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0057] 如本文所用,“TREM2”(也称为“髓系细胞触发受体2”、TREM2、TREM2a、TREM2b或TREM2c)是指属于免疫球蛋白超家族(IgSF)的跨膜糖蛋白。整个TREM2蛋白(SEQ ID NO:1)由以下组成:前导信号肽(氨基酸1-18)、单个V型IgSF胞外区(氨基酸19-132)、茎区(氨基酸133-172)、带正电荷的跨膜结构域(氨基酸173-197)和胞质尾(氨基酸198-230)(Feuerbach等人,Neurosci.Lett.[神经科学通讯]660(2017):109-114)。人TREM2基因映射于染色体位置6p21.1,并且TREM2基因的基因组序列可在GenBank中找到(基因ID:54209)。由于可变剪接,人体中存在三种TREM2同种型(在ENSEMBL中以ID ENSP00000362205、ENSP00000342651和ENSP00000362214可获得的蛋白质序列)。术语“TREM2”用于共同指代TREM2的所有同种型。最长的人TREM2同种型的蛋白质和mRNA序列是:

[0058] 髓系细胞触发受体2前体同种型1前体[智人](NP_061838.1)

[0059] MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIFLIKILAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPGLRDT

[0060] (SEQ ID NO:1)

[0061] 在智人髓系细胞触发受体2(TREM2),转录变体1,mRNA(NCBI参考序列:NM_018965.3)

[0062]
```
gggcagcgcc tgacatgcct gatcctctct tttctgcagt tcaagggaaa gacgagatct
tgcacaaggc actctgcttc tgcccttggc tggggaaggg tggcatggag cctctccggc
tgctcatctt actctttgtc acagagctgt ccggagccca caacaccaca gtgttccagg
gcgtggcggg ccagtccctg caggtgtctt gcccctatga ctccatgaag cactgggggа
ggcgcaaggc ctggtgccgc cagctgggag agaagggccc atgccagcgt gtggtcagca
cgcacaactt gtggctgctg tccttcctga ggaggtggaa tgggagcaca gccatcacag
acgataccct gggtggcact ctcaccatta cgctgcggaa tctacaaccc catgatgcgg
gtctctacca gtgccagagc ctccatggca gtgaggctga caccctcagg aaggtcctgg
tggaggtgct ggcagacccc ctggatcacc gggatgctgg agatctctgg ttccccgggg
agtctgagag cttcgaggat gcccatgtgg agcacagcat ctccaggagc ctcttggaag
gagaaatccc cttcccaccc acttccatcc ttctcctcct ggcctgcatc tttctcatca
agattctagc agccagcgcc ctctgggctg cagcctggca tggacagaag ccagggacac
atccacccag tgaactggac tgtggccatg acccagggta tcagctccaa actctgccag
ggctgagaga cacgtgaagg aagatgatgg gaggaaaagc ccaggagaag tcccaccagg
gaccagccca gcctgcatac ttgccacttg gccaccagga ctccttgttc tgctctggca
agagactact ctgcctgaac actgcttctc ctggaccctg gaagcaggga ctggttgagg
gagtggggag gtggtaagaa cacctgacaa cttctgaata ttggacattt taaacactta
caaataaatc caagactgtc atatttagct ggataaaaaa aaaaaaaaaa  aaaaaa
```

[0063] (SEQ ID NO:133)

[0064] 人TREM2同种型2(SEQ ID NO:2)和同种型3(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列示于图1A中。如本文所用,人TREM2蛋白还涵盖在其全长上与SEQ ID NO:1、2或3中的任一个具有至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的蛋白质,其中此类蛋白质仍然具有配体结合、细胞内信号传导、促进吞噬作用和吞噬物质的降解、以及TREM2的其他调节功能。鼠、食蟹猴(cyno)和其他动物TREM2蛋白的序列是本领域已知的(例如,对于鼠TREM2蛋白,NP_112544.1和NP_001259007.1)。

[0065] 术语“细胞外结构域”是指跨膜蛋白的一部分,其暴露在细胞的脂质双层的细胞外侧。确定蛋白质的胞外域的方法是本领域已知的(Singer(1990);High等人(1993),和McVector软件,牛津分子公司(Oxford Molecular))。例如,人TREM2蛋白的细胞外结构域可包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基19至172。

[0066] 术语TREM2的“胞外域”是指TREM2胞外结构域的一部分,其在脱落酶切割后释放。据报道,切割位点位于氨基酸H157和S158之间(Feuerbach等人,Neurosci.Lett.[神经科学通讯]660(2017):109-114)。因此,hTREM2的胞外域将由SEQ ID NO:1、2或3中任一个的氨基酸19-157组成。

[0067] 术语“IgSF结构域”是指TREM2的细胞外结构域的一部分,其含有免疫球蛋白(Ig)型折叠并且因此属于免疫球蛋白超家族。例如,在人中,IgSF结构域由SEQ ID NO:1、2和3中任一个的氨基酸残基19至132组成。

[0068] 术语TREM2的“茎区”是指TREM2的细胞外结构域的一部分,其连接V型免疫球蛋白(IgSF)结构域和跨膜结构域。例如,人TREM2同种型1蛋白的茎区可包括SEQ ID NO:1的氨基酸133-172。

[0069] 术语“跨膜结构域”是跨膜蛋白的指跨越细胞的脂质双层的部分。用于确定蛋白质的跨膜结构域的方法是本领域已知的(Elofsson等人,Annu.Rev.Biochem.[生物化学年鉴]76(2007):125-140;Bernsel等人,Protein Science[蛋白质科学]14(2005):1723-1728)。

[0070] 术语“细胞质结构域”和“细胞质尾”可互换使用并且指跨膜蛋白的一部分,其位于细胞的脂质双层的细胞质侧。用于确定蛋白质的细胞质尾的方法是本领域已知的(Elofsson等人(2007)和Bernsel等人(2005))。

[0071] 如本文所用,术语“稳定”是指将表达TREM2的细胞中的TREM2细胞表面水平维持、恢复或增加例如至在没有炎症或神经退行性疾病的健康受试者中相应的表达TREM2的细胞中的TREM2水平。这可以通过例如减少或抑制TREM2胞外域的脱落,或通过增加TREM2的细胞表面表达来实现。TREM2细胞表面水平可以通过流式细胞术/FACS或通过TREM2细胞表面免疫沉淀或通过可溶性TREM2随时间的减少来评估。TREM2细胞表面表达也可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、生物测定(例如,吞噬作用增加)、蛋白质印迹测定、流式细胞术、免疫组织化学、免疫荧光测定、均相时间分辨荧光(HTRF)、或正电子发射断层扫描(PET)来检测。

[0072] 本文的术语“活化”是指在细胞表面表达的TREM2的下游信号传导的起始或保持,例如在健康受试者中的或具有炎性或神经退行性疾病的个体(其中适当的TREM2依赖性活性受损)中的表达TREM2的细胞中。这可以实现,但不限于TREM2相关DAP12或DAP10的磷酸化,其通过不同的细胞内信号级联导致Syk磷酸化增强,吞噬作用,靶向细胞运动性增强(趋

化性),细胞存活增加,调节表达TREM2的细胞的细胞因子或趋化因子释放,增加细胞内吞噬物质的降解或基因表达的改变。可通过蛋白质印迹、ELISA或流式细胞术/FACS评估增加的TREM2依赖性DAP12或Syk磷酸化。可以通过生物测定来评估细胞的定向运动性,例如趋化性。可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫测定(RIA)或流式细胞术/FACS评估细胞因子释放的调节。基因表达的变化可以通过mRNA水平的定量RT-PCR或通过蛋白质水平上的蛋白质印迹或流式细胞术来评估。

[0073] 本文的术语"促进"是指受疾病损害的TREM2依赖性活性的增强或恢复。这些活动可包括吞噬作用,增加的靶向细胞运动性(趋化性),增加的细胞存活,调节表达TREM2的细胞的细胞因子或趋化因子释放,增加细胞内吞噬物质的降解,调节邻近细胞(星形胶质细胞/神经元)的细胞反应或基因表达的改变。

[0074] 如本文所用,术语"抗体"是指衍生自特异性结合抗原的免疫球蛋白分子的蛋白质、或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆、多链或单链、或完整免疫球蛋白,并且可以衍生自天然来源或来自重组来源。天然存在的"抗体"是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补性决定区(CDR),其间穿插有称为框架区(FR)的较保守区。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q))的结合。抗体可以是单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼源化(camelised)抗体或嵌合抗体。这些抗体可以具有任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在整个文件中,除非上下文另有说明,术语"抗体"或"抗体分子"还包括其任何片段及其任何衍生物。

[0075] 术语"抗体片段"或"抗原结合片段"是指抗体的至少一部分,该至少一部分保留与抗原表位特异性地相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定/去稳定、空间分布)的能力。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、scFv抗体片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、线性抗体、单结构域抗体如sdAb(VL或VH)、骆驼科VHH结构域、由抗体片段(如包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段)形成的多特异性抗体、和分离的CDR、或抗体的其他表位结合片段。抗原结合片段还可以掺入到单结构域抗体、大型抗体(maxibodies)、微型抗体(minibodies)、纳米抗体、细胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology[自然生物技术]23:1126-1136,2005)。还可以将抗原结合片段移植到基于多肽如纤连蛋白III型(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽微型抗体)。术语"scFv"是指融合蛋白,其包含至少一个包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段,其中该轻链可变区和重链可变区例如通过合成接头(例如短柔性多肽接头)是连续连接的并且能够表达为单链多肽,并且其中scFv保留了它所来源的完整抗体的特异性。除非另有说明,否则如本文所用,scFv可以例如相对于多肽的N末端和C末端以任何顺序具有VL和VH可变区,该scFv可以包含VL-接头-VH或者可以包含VH-接

头-VL。

[0076] 如本文所用,所述术语“互补性决定区”或“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可变区内的氨基酸的序列。例如,一般来说,每个重链可变区中存在三个CDR(例如HCDR1、HCDR2、和HCDR3),并且每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、和LCDR3)。给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任一种来确定,这些方案包括由以下文献描述的那些:卡巴特等人(1991),″Sequences of Proteins of Immunological Interest″[具有免疫学重要性的蛋白序列],第5版,美国国立卫生研究院,公共卫生事业部,马里兰州贝塞斯达市(“卡巴特(Kabat)”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“乔西亚(Chothia)”编号方案)、或其组合,以及ImMunoGenTics(IMGT)编号(Lefranc,M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003);Lefranc等人,(2015)Nucleic Acids Res.[核酸研究]43,D413-422)(“IMGT”编号方案)。在针对给定CDR区(例如,HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)的组合卡巴特和乔西亚编号方案中,在一些实施例中,这些CDR对应于被定义为卡巴特CDR的一部分的氨基酸残基,以及被定义为乔西亚CDR的一部分的氨基酸残基。如本文所用的,根据“乔西亚”编号方案定义的CDR有时也称为“高变环”。在IMGT下,可以使用程序IMGT/DomainGap Align确定抗体的CDR区。通常,除非特别指出,否则所述抗体分子可包括一种或多种卡巴特CDR和/或乔西亚CDR的任何组合。

[0077] 术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸或碳水化合物或糖侧链,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。构象表位和线性表位差别例如在于:在变性溶剂的存在下,对构象表位(而不是非构象表位)的结合丧失。

[0078] “与……结合相同的表位”抗体、抗体片段或其他抗原结合部分与特定抗原结合并且与示例性抗体结合相同的表位(当使用该相同的表位作图技术比较抗体时)。可以使用表位作图技术确定示例性抗体和其他抗体的表位。表位作图技术在本领域中是公知的。例如,通过测定氨基酸的空间构象如通过氢/氘交换、X射线晶体学和二维核磁共振,可以容易地鉴定构象表位。

[0079] 在另一个实施例中,本披露涉及与表1中描述的抗体交叉竞争的抗体或抗体片段。

[0080] 在一个实施例中,本披露涉及抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段与包含表1中的一种或多种抗体的由卡巴特、乔西亚、IMGT或组合的卡巴特/乔西亚方法定义的6个CDR的抗体或抗体片段交叉竞争。

[0081] 在另一个实施例中,本披露涉及与表1中的抗体之一结合(例如,通过结合和/或稳定)相同表位的抗体或抗体片段。

[0082] 在另一个实施例中,所述抗体或其抗原结合片段结合(例如,通过结合和/或稳定)与包含由表1中任一抗体的卡巴特、乔西亚、IMGT或卡巴特/乔西亚组合方法中的任何一种定义的6个CDR的抗体或抗体片段的表位重叠的表位。

[0083] 如本文所用的术语“单价抗体”是指结合靶分子上的单个表位的抗体。

[0084] 如本文所用的术语“二价抗体”是指结合至少两个相同靶分子上的两个表位的抗

体。二价抗体还可以使靶分子彼此交联。“二价抗体”还指结合至少两个相同靶分子上的两个不同表位的抗体。

[0085] 术语“多价抗体”是指具有多于一个化合价的单个结合分子,其中“化合价”被描述为每分子抗体构建体中存在的抗原结合部分的数目。因此,单个结合分子可以结合靶分子上多于一个结合位点。多价抗体的实例包括但不限于二价抗体、三价抗体、四价抗体、五价抗体等、以及双特异性抗体和双旁原位抗体。例如,对于TREM2,多价抗体(例如,TREM2双互补位抗体)分别具有针对TREM2的两个结构域的结合部分。

[0086] 术语“多价抗体”还指对于两个分开的靶分子具有多于一个抗原结合部分的单个结合分子。例如,结合TREM2的抗体和不是TREM2的第二靶分子。在一个实施里中,多价抗体是具有四个表位结合结构域的四价抗体。对于该靶分子上的每个结合位点,四价分子可以是双特异性和二价的。

[0087] 如本文所用的术语“双特异性抗体”是指结合两种或更多种不同表位的抗体。在一些实施例中,双特异性抗体与两种不同的靶标结合。在一些实施例中,双特异性抗体结合单个靶分子上的两个不同表位。结合单个靶分子上的两个不同表位的抗体也称为“双互补位抗体”。

[0088] 如本文所用的短语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有基本上相同的氨基酸序列或源自相同的遗传来源的多肽(包括抗体、双特异性抗体等)。此术语还包括具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0089] 如本文所用,短语“人抗体”包括具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者均源自人来源的序列。恒定区还源自人序列,例如人种系序列或突变形式的人种系序列,或含有衍生自人框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如,如描述于Knappik等人(2000.J Mol Biol[分子生物学杂志]296,57-86)。免疫球蛋白可变结构域(例如CDR)的结构和位置可使用众所周知的编号方案来定义,例如,卡巴特编号方案,乔西亚编号方案,或卡巴特和乔西亚的组合,和ImMunoGenTics(IMGT)编号(参见,例如Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学相关蛋白质序列],美国卫生与公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services)(1991),编辑Kabat等人;Al Lazikani等人,(1997)J.Mol.Bio.[分子生物学杂志]273:927 948;Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学相关蛋白序列],第5版,NIH公开号91-3242美国卫生与公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services);Chothia等人,(1987)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917;Chothia等人,(1989)Nature[自然]342:877-883;和Al-Lazikani等人,(1997)J.Mal.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948;Lefranc,M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003);Lefranc等人,(2015)Nucleic Acids Res.[核酸研究]43,D413-422。

[0090] 本发明的人抗体可以包括不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变、或通过在体内体细胞突变、或保守取代来引入突变以促进稳定性或生产)。然而,如本文所用的术语“人类抗体”不旨在包括其中源自另一种哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列已被移植到人类框架序列中的抗体。

[0091] 如本文使用的,短语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,比如从动物(例如,小鼠)(该动物对于人免疫球蛋白是转基因的或转染色体的)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体;从转化以表达人抗体的宿主细胞中分离的抗体(例如,来自转染瘤中);从重组,组合的人抗体文库中分离的抗体;以及通过任何其他方式(涉及将全部或部分的人免疫球蛋白基因、序列剪接到其他DNA序列)制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有可变区,其中构架区和CDR区衍生自人种系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施例中,可以对此类重组人抗体进行体外诱变(或,当使用转基因人Ig序列的动物时,进行体内体细胞诱变),并因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是衍生自人种系VH和VL序列的和与其相关的序列,这些序列在体内可能不天然存在于人抗体种系库中。

[0092] 如本文所用的术语“Fc区”是指包含抗体的恒定结构域的CH3、CH2和铰链区的至少一部分的多肽。任选地,Fc区可以包含在一些抗体种类中存在的CH4结构域。Fc区可以包含抗体恒定区的整个铰链区。在一个实施例中,本发明包括抗体的Fc区和CH1区。在一个实施例中,本发明包括抗体的Fc区和CH3区。在另一个实施例中,本发明包括Fc区、CH1区和来自抗体恒定结构域的Cκ/λ区。在一个实施例中,本发明的结合分子包含恒定区,例如重链恒定区。在一个实施例中,与野生型恒定区相比,这类恒定区是经修饰的。即,本文公开的本发明的多肽可以包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定区结构域(CL)的改变或修饰。实例修饰包括在一个或多个结构域中添加、缺失或取代一个或多个氨基酸。可以包括此类改变,以优化效应子功能、半衰期等。

[0093] 如本文所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位点处抗体和抗原之间的相互作用强度。在每个抗原位点内,抗体的可变区通过弱非共价力在许多位点处与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。如本文所使用的,针对IgG抗体或其片段(例如Fab片段)的术语“高亲和力”是指对靶抗原具有10^{-8}M或更小、10^{-9}M或更小、或10^{-10}M、或10^{-11}M或更小、或10^{-12}M或更小、或10^{-13}M或更小的亲和力的抗体。然而,对于其他抗体同种型,“高亲和力”结合可以变化。例如,对于IgM同种型的“高亲和力”结合是指抗体具有10^{-7}M或更低或10^{-8}M或更低的亲和力。

[0094] 如本文所用,术语“Kassoc”、“Ka”或“K_{on}”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而如本文所用的术语“Kdis”、“Kd”或“K_{off}”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。在一个实施例中,如本文所用,术语“KD”(或“K_D”)旨在指解离常数,其由Kd与Ka的比(即Kd/Ka)获得并表示为摩尔浓度(M)。可以使用本领域中已确立的方法确定抗体的KD值。用于测定抗体的KD的方法是通过使用表面等离子共振,或者使用生物传感器系统,如Biacore®系统。

[0095] 如本文所用,术语“亲合力”是指抗体-抗原复合物的总体稳定性或强度的信息量度。它受三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体二者的化合价;以及相互作用部分的结构布置。最终,这些因素决定了抗体的特异性,即特定抗体与精确抗原表位结合的可能性。

[0096] 如本文所用,术语“结合特异性”或“特异性结合”是指单个抗体结合位点与一种抗原决定簇而不与不同的抗原决定簇反应的能力。抗体的结合位点位于分子的Fab部分中,并且由重链和轻链的高变区构建。抗体的结合亲和力是单个抗原决定簇与抗体上的单个结合位点之间的反应强度。它是在抗原决定簇与抗体的结合位点之间运行的吸引力和排斥力的

总和。

[0097] 术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是减缓不希望的生理变化或障碍。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于减轻症状、降低疾病程度、疾病状态稳定(即,不恶化)、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态以及缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可以意指与不接受治疗的预期存活相比延长存活。

[0098] 有关任何特定疾病或障碍的术语“预防(prevention)”、“预防(prevent)”和“进行预防(preventing)”是指预防的(prophylactic)或预防性(preventive)措施,例如在该疾病或障碍的任何症状出现之前向受试者施用本发明化合物。

[0099] 术语“受试者”是指向其提供根据本发明的方法的治疗的动物、人、或非人。考虑了兽医应用和非兽医应用。该术语包括但不限于哺乳动物,例如人、其他灵长类动物、猪、啮齿动物如小鼠和大鼠、兔、豚鼠、仓鼠、牛、马、猫、狗、绵羊和山羊。典型的受试者包括人、农场动物和家养宠物,如猫和狗。在一些优选的实施例中,受试者是人。

[0100] “有效量”是指足以产生有益或所希望的结果的量。例如,治疗量为达到所需疗效的量。所述量可与预防上有效量相同或不同,所述预防上有效量为预防疾病或疾病症状的发作所需的量。可以在一次或多次施用或应用或给药时施用有效量。治疗化合物的“治疗有效量”(即,有效剂量)取决于所选择的治疗化合物。组合物能以每天一次或多次至每周一次或多次施用;包括每隔一天一次。技术人员将理解,某些因素可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时程,包括但不限于疾病或障碍的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄,以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的在此描述的治疗化合物对受试者进行的治疗可以包括单一治疗或一系列治疗。

[0101] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有已知的天然核苷酸类似物的核酸,这些核酸具有与参考核酸类似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸类似的方式进行代谢。除非另外指出,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得,在这些序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子与细胞探针]8:91-98(1994))。

[0102] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用,并且是指包含由肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含由肽键彼此相连的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链,例如其在本领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚体;并且还是指较长的链,其在本领域中通常称为蛋白质,存在有很多类型的蛋白质。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、或其组合。

[0103] 术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已

知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本发明的抗体或抗体片段中。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中进行了定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明的抗体或其抗原结合片段内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换,并且可以使用本文描述的功能测定法测试改变的抗体或抗原结合片段。

[0104] 术语“同源的”或“相同的”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子(如两个DNA分子或两个RNA分子)之间或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当这两个分子中的亚基位置被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中的每一个中的位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源的或相同的。两个序列之间的同源性是匹配位置或同源位置的数量的直接函数;例如,如果两个序列中一半的位置(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配的或同源的,则这两个序列是90%同源的。可以通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性”的百分比,其中比较窗口中的氨基酸序列的片段可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比的添加或缺失(例如,空缺或突出端)以使两个序列最佳比对。可以通过以下方法计算该百分比:测定在这两个序列中出现相同氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置数,将该匹配位置数除以该比较窗口中的位置总数,并将结果乘以100,从而得到序列同一性百分比。输出是主题序列关于查询序列的百分比同一性。

[0105] 术语“分离的”意指从天然状态改变的或去除的。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质能以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境(例如像,宿主细胞)中。“分离的抗体”基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如,特异性结合TREM2的分离的抗体基本上不含特异性结合除TREM2以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合靶分子的分离的抗体可以与来自其他物种的相同抗原具有交叉反应性,例如,特异性结合TREM2的分离的抗体可以结合来自其他物种的TREM2分子。分离的抗体可以是单克隆抗体。分离的抗体可以是重组单克隆抗体。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学品。

[0106] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管可以使用与本文所述那些方法和材料类似或等同的方法和材料来实践本发明,但是下面描述了合适的方法和材料。本文所提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过援引以其全文并入。在冲突存在的情况下,则以包括定义在内的本说明书为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的而不旨在限制。

[0107] 本发明的一个或多个实施例的细节陈述于附图和下文的描述中。根据说明书和附图并且如权利要求书,本发明的其他特征、目标和优点将是清楚的。

[0108] 使功能性TREM2稳定的抗体

[0109] 本文提供了使细胞表面上的TREM2稳定的抗体及其抗原结合片段。这些抗体或其

抗原结合片段可以通过干扰TREM2的蛋白水解切割和/或减少TREM2蛋白的胞外域的脱落来实现TREM2的稳定化。在一些优选的实施例中,那些抗体或其抗原结合片段特异性结合人TREM2的IgSF结构域,例如SEQ ID NO:1、2或3中任一个的氨基酸残基19至132。

[0110] 由于细胞表面TREM2的减少或缺失与人神经炎症和神经退行性病理相关,本文所述的稳定TREM2的抗体或其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断神经炎症和神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、如尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。在一些优选的实施例中,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗、预防或诊断选自阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病的疾病。

[0111] 由于它们的药理学特征,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗多种疾病或病症,如CNS相关疾病、PNS相关疾病、全身性炎症和与炎症、疼痛和滥用化学物质引起的戒断症状相关的其他疾病。与CNS相关的疾病或障碍包括广泛性焦虑障碍、认知障碍、学习和记忆缺陷和功能障碍、阿尔茨海默病(轻度、中度和重度)、注意力缺陷和多动障碍、帕金森病、帕金森病痴呆、亨廷顿病、ALS、慢性神经退行性障碍、如Creutzfeld-Jacob病和kuru病、抽动一秽语综合征、精神病、抑郁症和抑郁障碍、躁狂症、躁狂抑郁症、精神分裂症、精神分裂症的认知缺陷、强迫症、恐慌症、饮食障碍、发作性睡病、伤害感受、AIDS-痴呆、老年性痴呆、与年龄相关的轻度认知障碍(MCI)、年龄相关记忆障碍、孤独症、阅读障碍、迟发性运动障碍、癫痫、和惊厥性疾病、创伤后应激障碍、短暂性缺氧、假性痴呆、月经前期综合征、黄体晚期综合征、慢性疲劳综合征和时差。

[0112] 本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段特别适用于治疗、预防或诊断由TREM2的广泛蛋白水解切割或表达TREM2受体的异常或突变变体的细胞介导的或与其相关的自身免疫性障碍、炎性障碍或恶性障碍。自身免疫疾病的实例包括但不限于关节炎(例如类风湿性关节炎,慢性关节炎和畸形性关节炎)和风湿性疾病,包括炎性病症和涉及骨损失的风湿性疾病、炎性疼痛、脊柱炎(包括强直性脊柱炎)、莱特尔综合征、反应性关节炎、银屑病关节炎和肠道型关节炎(enterophathic arthritis)、超敏反应(包括气道超敏反应和皮肤超敏反应)和过敏症。自身免疫疾病包括自身免疫性血障液碍(包括例如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞性贫血和特发性血小板减少症)、系统性红斑狼疮、炎性肌紊乱、多软骨炎、巩膜瘤、韦格纳肉芽肿病、皮肌炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、银屑病、史蒂芬强森综合征、特发性口炎性腹泻、内分泌性眼病、格雷夫斯病、结节病、多发性硬化、原发性胆汁性肝硬化、青少年糖尿病(I型糖尿病)、葡萄膜炎(前部和后部)、干燥性角膜结膜炎和春季角膜结膜炎、间质性肺纤维化、银屑病关节炎和肾小球肾炎(有和没有肾病综合征,例如包括痛风、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、特发性肾病综合征或微小病变肾病)、肿瘤、皮肤和角膜炎症、肌炎、骨植入物松动、代谢紊乱、如动脉粥样硬化、糖尿病和脂代谢紊乱。

[0113] 本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段还可用于治疗、预防或改善哮喘,支气管炎,肺尘埃沉着病,肺气肿和气道的其他阻塞性或炎性疾病,包括特发性肺纤维化或COPD。

[0114] 本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗造血或肝细胞恶性障碍,例如急性髓性白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生性障碍、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、范可尼贫血(fanconi anemi)、重型地中海贫血症、威-奥二氏综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)、噬红细胞性淋巴细胞与组织细胞增多症。

[0115] 本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可用于治疗与异常TREM2活性和/或表达直接或间接相关的任何疾病或障碍。TREM2相关障碍包括:免疫障碍、特别是涉及炎性障碍(如细菌感染、真菌感染、病毒感染、原生动物或其他寄生虫感染、银屑病、败血症、脑疟疾、炎症性肠病、关节炎、(如类风湿性关节炎)、毛囊炎、脓疱疮、肉芽肿、类脂肺炎、血管炎、和骨关节炎)、自身免疫障碍(如类风湿性关节炎、甲状腺炎、(如桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯病)、胰岛素抗性糖尿病、恶性贫血、艾迪生病、天疱疮、白癜风、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮(SLE))、干燥综合征、多发性硬化、皮肌炎、混合性结缔组织病、硬皮病、多发性肌炎、移植排斥反应、(如同种异体移植排斥反应)、T细胞障碍(如艾滋病)、过敏性炎症性障碍(如皮肤和/或粘膜过敏,如过敏性鼻炎、哮喘、牛皮癣)、神经系统障碍、眼障碍、胚胎障碍或与TREM2异常活性和/或表达直接或间接相关的任何其他障碍(例如肿瘤、癌症、白血病、髓性疾病和创伤)。

[0116] 在一些实施例中,TREM2相关病症选自哮喘、脑炎、炎症性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏障碍、败血性休克、肺纤维化、未分化的脊椎关节炎(undifferentitated spondyloarthropathy)、未分化的关节炎、关节炎、炎症性骨质溶解或由慢性病毒性或细菌性感染所致的慢性炎症。

[0117] 在一些实施例中,TREM2相关障碍选自痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、混合性痴呆、克雅氏病、正常压力脑积水、肌萎缩侧索硬化、亨廷顿病、tau蛋白病、那须-哈科拉病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急慢性结肠炎、伤口愈合、克罗恩病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森病、路易体痴呆、多系统萎缩、多系统萎缩综合征(Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿性疾病、结节病、衰老疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼感染、全身性感染、狼疮、关节炎、多发性硬化、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨硬化病(osteopetrotic disease)、佩吉特骨病(Paget's disease of bone)和癌症。在一些优选的实施例中,TREM2相关障碍选自以下清单,该清单由以下组成:阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病。

[0118] 在一些优选的实施例中,TREM2相关障碍选自痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、那须-哈科拉病和多发性硬化。在一些优选的实施例中,TREM2相关障碍是痴呆,例如额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、语义性痴呆或具路易体痴呆。在更优选的实施例中,TREM2相关障碍是阿尔茨海默病。在另一个优选的实施例中,障碍是帕金森病。

[0119] 与人TREM2特异性结合的抗体和抗原结合片段

[0120] 在一个方面,本文提供了抗体或其抗原结合片段,例如单克隆抗体或其抗原结合

片段,其特异性结合人TREM2蛋白(“hTREM2抗体或其抗原结合片段”)的IgSF结构域。那些抗体或抗原结合片段可以稳定细胞表面上的TREM2蛋白,和/或减少TREM2蛋白的胞外域的脱落。

[0121] 在一些实施例中,本文提供的hTREM2抗体或其抗原结合片段包括重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)和轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)。在一些实施例中,本文提供的hTREM2抗体或抗原结合片段包括包含CDR1、CDR2和CDR3的重链可变区(VH)和包含CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变区(VL)。在一些实施例中,本文提供的hTREM2抗体或抗原结合片段包括全长重链序列(HC)和全长轻链序列(LC)。

[0122] 表1列出了示例性TREM2抗体或特异性结合人TREM2蛋白的抗原结合片段的序列。在本申请的全文中,如果说明书文本(例如,表1)与序列表之间存在差异,则以说明书文本为准。

[0123] 表1.结合人TREM2的示例性单克隆抗体的序列。

[0124]

MOR44698A		
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (组合的)	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (组合的)	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (组合的)	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (卡巴特)	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (卡巴特)	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (卡巴特)	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 8	HCDR1 (乔西亚)	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2 (乔西亚)	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (乔西亚)	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1 (IMGT)	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2 (IMGT)	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3	ARIPSYTYAFDY

[0125]

	(IMGT)	
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 14	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAACCGGGT GCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT GGTTACCATATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGGATGGGCGTTATCAACCCGGTTTCTGGCAACACGGTTTAC GCGCAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGC ATTAGCACCGCGTATATGGAACTGAGCCGTCTGCGTAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCCGTCTTACACTTACGCT TTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 15	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAACCGGGT GCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT GGTTACCATATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGGATGGGCGTTATCAACCCGGTTTCTGGCAACACGGTTTAC GCGCAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGC ATTAGCACCGCGTATATGGAACTGAGCCGTCTGCGTAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCCGTCTTACACTTACGCT TTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCC TCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (组合的)	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 (组合的)	RASSLQS

[0126]

SEQ ID NO: 19	LCDR3（组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1（卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2（卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1（乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3（乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1（IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 25	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCT AACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACCGTGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCTTCCAG TACCGTCATATGCCGTCTCAGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTT GAAATTAAA
SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 27	DNA 轻链	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCT AACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACCGTGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCTTCCAG TACCGTCATATGCCGTCTCAGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTT GAAATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGCGAGTGT
MOR44698B		
SEQ ID NO: 4	HCDR1（组合的）	GYTFTGYHMS

SEQ ID NO: 5	HCDR2（组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（卡巴特）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 8	HCDR1（乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2（乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3（乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1（IMGT）	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2（IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3（IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 29	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	DNA 重链	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCC TCCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTG

[0127]

[0128]

		ACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTG GGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAC GAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTG CCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTAC CCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （组合的）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1 （乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3 （乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1 （IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAG

SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
MOR44698C		
SEQ ID NO: 4	HCDR1（组合的）	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（卡巴特）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 8	HCDR1（乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2（乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3（乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1（IMGT）	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2（IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3（IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT

[0129]

[0130]

		ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 33	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 34	DNA 重链	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCC TCCACTAAGGGCCCGTCAGTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAG TCAACCTCCGGAGGAACTGCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGAC TATTTCCCGGAACCCGTCACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTC ACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGC CTGTACTCCCTGAGCTCCGTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTG GGAACCCAAACCTACATTTGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAAC ACTAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACC CACACCTGTCCTCCCTGTCCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCT TCCGTGTTCCTGTTCCCGCCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATC TCCCGCACTCCGGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGCCGTGTCCCAC GAGGACCCCGAGGTCAAGTTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCC ACCTACCGCGTGGTGTCCGTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGG CTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTG GCTGCCCCTATCGAAAAGACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCT AGGGAGCCCCAGGTGTACACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATG ACTAAGAACCAGGTGTCGCTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTAC CCCTCTGACATCGCCGTGGAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAG AACAACTATAAGACCACACCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTGTACTCAAAGTTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAA CAGGGCAACGTGTTCTCTTGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCAC AACCACTACACCCAAAAGTCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （组合的）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1	SQDISNY

[0131]

	（乔西亚）	
SEQ ID NO: 21	LCDR2（乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3（乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1（IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAG
SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
MOR44698D		
SEQ ID NO: 4	HCDR1（组合的）	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3	IPSYTYAFDY

[0132]

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 8	HCDR1（乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2（乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3（乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1（IMGT）	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2（IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3（IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 35	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 36	DNA 重链	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCC TCCACTAAGGGCCCGTCAGTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAG TCAACCTCCGGAGGAACTGCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGAC TATTTCCCGGAACCCGTCACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTC ACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGC CTGTACTCCCTGAGCTCCGTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTG GGAACCCAAACCTACATTTGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAAC ACTAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACC CACACCTGTCCTCCCTGTCCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCT TCCGTGTTCCTGTTCCCGCCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATC TCCCGCACTCCGGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCAC GAGGACCCCGAGGTCAAGTTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCC ACCTACCGCGTGGTGTCCGTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGG

[0133]

		CTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTG CCAGCCCCTATCGAAAAGACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCT AGGGAGCCCCAGGTGTACACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATG ACTAAGAACCAGGTGTCGCTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTAC CCCTCTGACATCGCCGTGGAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAG AACAACTATAAGACCACACCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTGTACTCAAAGTTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAA CAGGGCAACGTGTTCTCTTGCTCCGTGCTGCACGAAGCCCTGCAC AGCCACTACACCCAAAAGTCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （组合的）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1 （乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3 （乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1 （IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAG
SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT

[0134]

		AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
MOR44698E		
SEQ ID NO: 4	HCDR1 （组合的）	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 （组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 （组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1 （卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2 （卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3 （卡巴特）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 8	HCDR1 （乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2 （乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3 （乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1 （IMGT）	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2 （IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3 （IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 37	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

[0135]

		TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 38	DNA 重链	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCC TCCACTAAGGGCCCGTCAGTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAG TCAACCTCCGGAGGAACTGCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGAC TATTTCCCGGAACCCGTCACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTC ACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGC CTGTACTCCCTGAGCTCCGTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTG GGAACCCAAACCTACATTTGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAAC ACTAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACC CACACCTGTCCTCCCTGTCCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCT TCCGTGTTCCTGTTCCCGCCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATC TCCCGCACTCCGGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGCCGTGTCCCAC GAGGACCCCGAGGTCAAGTTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCC ACCTACCGCGTGGTGTCCGTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGG CTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTG GCTGCCCCTATCGAAAAGACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCT AGGGAGCCCCAGGTGTACACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATG ACTAAGAACCAGGTGTCGCTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTAC CCCTCTGACATCGCCGTGGAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAG AACAACTATAAGACCACACCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTGTACTCAAAGTTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAA CAGGGCAACGTGTTCTCTTGCTCCGTGCTGCACGAAGCCCTGCAC AGCCACTACACCCAAAAGTCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1（组合的）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2（组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1（卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2（卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1（乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3（乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1（IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（IMGT）	RAS

[0136]

SEQ ID NO: 19	LCDR3（IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAG
SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
MOR44698F		
SEQ ID NO: 4	HCDR1（组合的）	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（卡巴特）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 8	HCDR1（乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2（乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3（乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1（IMGT）	GYTFTGYH

[0137]

SEQ ID NO: 11	HCDR2（IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3（IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 39	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 40	DNA 重链	CAAGTGCAACTCGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCTGGA GCCTCGGTCAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGATACACTTTCACT GGATACCACATGTCGTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCCAAGGGCTG GAGTGGATGGGCGTCATCAACCCGGTGTCGGGTAATACCGTGTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGTCGCGTGACCATGACCCGGGATACCTCC ATTAGCACCGCGTACATGGAGCTCAGCCGGTTGAGATCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGATCCCGTCCTACACTTACGCC TTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCC TCCACTAAGGGCCCGTCAGTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAG TCAACCTCCGGAGGAACTGCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGAC TATTTCCCGGAACCCGTCACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTC ACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGC CTGTACTCCCTGAGCTCCGTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTG GGAACCCAAACCTACATTTGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAAC ACTAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACC CACACCTGTCCTCCCTGTCCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCT TCCGTGTTCCTGTTCCCGCCCAAGCCAAAAGACACCCTGTATATC ACTCGCGAACCGGAAGTCACTTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCAC GAGGACCCCGAGGTCAAGTTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCC ACCTACCGCGTGGTGTCCGTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGG CTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTG CCAGCCCCTATCGAAAAGACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCT AGGGAGCCCCAGGTGTACACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATG ACTAAGAACCAGGTGTCGCTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTAC CCCTCTGACATCGCCGTGGAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAG AACAACTATAAGACCACACCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTGTACTCAAAGTTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAA CAGGGCAACGTGTTCTCTTGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCAC AACCACTACACCCAAAAGTCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 17	LCDR1	RASQDISNYLA

[0138]

	（组合的）	
SEQ ID NO: 18	LCDR2（组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（组合的）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 17	LCDR1（卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2（卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（卡巴特）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 20	LCDR1（乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3（乔西亚）	YRHMPSQ
SEQ ID NO: 23	LCDR1（IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2（IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3（IMGT）	FQYRHMPSQT
SEQ ID NO: 24	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 31	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAG
SEQ ID NO: 26	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ YRHMPSQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGATATTTCC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACCGGGCGTCCTCCTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCTTCCAG TACCGGCACATGCCCTCACAAACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTC GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGC CTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC

[0139]

MOR44746A		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（组合的）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1（卡巴特）	SSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 51	DNA VH	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGC CAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGC TCTTCTTCTGCTGCTTGGAACTGGATTCGTCAGAGCCCGAGCCGT GGCCTCGAGTGGCTGGGCCATATCGGTTACCGTAGCAAATGGTAC AACGAATATGCCGTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCG GATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACC CCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATGTACGGT TCTGTTCCCTACAAAGAAGGTTACTACTTCGATATTTGGGGCCAA GGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 52	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 53	DNA 重链	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGAGC CAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGC TCTTCTTCTGCTGCTTGGAACTGGATTCGTCAGAGCCCGAGCCGT GGCCTCGAGTGGCTGGGCCATATCGGTTACCGTAGCAAATGGTAC AACGAATATGCCGTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCCG GATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGCAACTGAACAGCGTGACC

[0140]

		CCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTATGTACGGT TCTGTTCCCTACAAAGAAGGTTACTACTTCGATATTTGGGGCCAA GGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （组合的）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （卡巴特）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 （乔西亚）	SQGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 （乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1 （IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 62	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTTCT

		TCTGACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACGCTGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAG TACACTGACGAATCTATGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA ATTAAA
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 64	DNA 轻链	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGGTATTTCT TCTGACCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACGCTGCTTCTAACCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAG TACACTGACGAATCTATGACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA ATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAGTGT
MOR44746B		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（组合的）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1（卡巴特）	SSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS

[0141]

[0142]

SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 66	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 67	DNA 重链	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCCTCCACTAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACT GCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC GTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCC CCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAC AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3	QQYTDESMT

[0143]

	（组合的）	
SEQ ID NO: 54	LCDR1（卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2（卡巴特）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3（卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1（乔西亚）	SQGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3（乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1（IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3（IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAG
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MOR44746C		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2	HIGYRSKWYNEYAVSVKS

	（组合的）	
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1（卡巴特）	SSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 70	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 71	DNA 重链	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCCTCCACTAAGGGCCCGTCA GTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAGTCAACCTCCGGAGGAACT

[0144]

		GCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGACTATTTCCCGGAACCCGTC ACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTCACCAGCGGAGTGCATACC TTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCC GTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTGGGAACCCAAACCTACATT TGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAACACTAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGT CCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCG CCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCTCCCGCACTCCGGAAGTC ACTTGCGTGGTCGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTCAAG TTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCC GTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTAC AAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTGGCTGCCCCTATCGAAAAG ACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCTAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATGACTAAGAACCAGGTGTCG CTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTACCCCTCTGACATCGCCGTG GAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAGAACAACTATAAGACCACA CCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCAAAG TTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCTCT TGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAG TCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （组合的）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （卡巴特）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 （乔西亚）	SQGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 （乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1 （IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG

[0145]

[0146]

		TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAG
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MOR44746D		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（组合的）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1（卡巴特）	SSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC

[0147]

		AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 72	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 73	DNA 重链	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCCTCCACTAAGGGCCCGTCA GTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAGTCAACCTCCGGAGGAACT GCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGACTATTTCCCGGAACCCGTC ACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTCACCAGCGGAGTGCATACC TTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCC GTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTGGGAACCCAAACCTACATT TGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAACACTAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGT CCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCG CCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCTCCCGCACTCCGGAAGTC ACTTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTCAAG TTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCC GTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTAC AAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTGCCAGCCCCTATCGAAAAG ACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCTAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATGACTAAGAACCAGGTGTCG CTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTACCCCTCTGACATCGCCGTG GAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAGAACAACTATAAGACCACA CCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCAAAG TTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCTCT TGCTCCGTGCTGCACGAAGCCCTGCACAGCCACTACACCCAAAAG TCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （组合的）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2	AASNLQS

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 56	LCDR3（卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1（乔西亚）	SQGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3（乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1（IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3（IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAG
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MOR44746E		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（组合的）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1	SSSAAWN

[0148]

[0149]

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG
SEQ ID NO: 74	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 75	DNA 重链	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCCTCCACTAAGGGCCCGTCA GTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAGTCAACCTCCGGAGGAACT GCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGACTATTTCCCGGAACCCGTC ACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTCACCAGCGGAGTGCATACC TTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCC GTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTGGGAACCCAAACCTACATT TGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAACACTAAGGTGGACAAGAGA

[0150]

		GTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGT CCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCG CCCAAGCCAAAAGACACCCTGATGATCTCCCGCACTCCGGAAGTC ACTTGCGTGGTCGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTCAAG TTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCC GTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTAC AAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTGGCTGCCCCTATCGAAAAG ACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCTAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATGACTAAGAACCAGGTGTCG CTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTACCCCTCTGACATCGCCGTG GAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAGAACAACTATAAGACCACA CCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCAAAG TTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCTCT TGCTCCGTGCTGCACGAAGCCCTGCACAGCCACTACACCCAAAAG TCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （组合的）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （卡巴特）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 （乔西亚）	SQGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 （乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1 （IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2 （IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAG
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL

[0151]

		LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MOR44746F		
SEQ ID NO: 41	HCDR1（组合的）	GDSVSSSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（组合的）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（组合的）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 44	HCDR1（卡巴特）	SSSAAWN
SEQ ID NO: 42	HCDR2（卡巴特）	HIGYRSKWYNEYAVSVKS
SEQ ID NO: 43	HCDR3（卡巴特）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 45	HCDR1（乔西亚）	GDSVSSSSA
SEQ ID NO: 46	HCDR2（乔西亚）	GYRSKWY
SEQ ID NO: 43	HCDR3（乔西亚）	GMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 47	HCDR1（IMGT）	GDSVSSSSAA
SEQ ID NO: 48	HCDR2（IMGT）	IGYRSKWYN
SEQ ID NO: 49	HCDR3（IMGT）	ARGMYGSVPYKEGYYFDI
SEQ ID NO: 50	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCG

[0152]

SEQ ID NO: 76	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSSSAAWNWIRQSPSR GLEWLGHIGYRSKWYNEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGMYGSVPYKEGYYFDIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 77	DNA 重链	CAAGTGCAACTCCAGCAGTCAGGACCGGGGTTGGTCAAGCCTTCG CAGACCCTGTCCCTCACTTGCGCCATTAGCGGAGATTCGGTGTCG TCGTCGTCAGCCGCCTGGAACTGGATTAGACAGTCCCCTTCCCGA GGGCTGGAGTGGCTGGGCCACATCGGATACCGCAGCAAGTGGTAC AACGAATACGCCGTCAGCGTGAAGTCACGCATCACCATCAACCCG GATACTAGCAAGAACCAGTTCAGCCTCCAGTTGAACTCCGTGACC CCGGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGGGCATGTACGGA TCCGTGCCGTACAAGGAGGGATACTACTTCGACATTTGGGGCCAG GGGACTCTTGTCACCGTGTCCTCGGCCTCCACTAAGGGCCCGTCA GTGTTCCCCCTTGCGCCATCCTCGAAGTCAACCTCCGGAGGAACT GCCGCACTGGGTTGCCTCGTGAAAGACTATTTCCCGGAACCCGTC ACTGTCTCCTGGAACTCAGGAGCGCTCACCAGCGGAGTGCATACC TTTCCTGCGGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCTCC GTCGTGACCGTCCCCTCGTCGTCCCTGGGAACCCAAACCTACATT TGCAACGTCAATCACAAGCCAAGCAACACTAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGTCCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGT CCGGCACCTGAACTGCTTGGTGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCG CCCAAGCCAAAAGACACCCTGTATATCACTCGCGAACCGGAAGTC ACTTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTCAAG TTTAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCC GTCCTGACTGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTAC AAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCACTGCCAGCCCCTATCGAAAAG ACTATCTCCAAGGCCAAGGGCCAACCTAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACGTTGCCTCCTTCCCGCGAAGAAATGACTAAGAACCAGGTGTCG CTGACCTGTCTCGTGAAAGGGTTCTACCCCTCTGACATCGCCGTG GAATGGGAGTCAAACGGACAGCCTGAGAACAACTATAAGACCACA CCACCTGTCCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCAAAG TTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCTCT TGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAG TCGCTCAGCCTCTCCCCCGGAAAG
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （组合的）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （组合的）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （组合的）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISSDLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 （卡巴特）	AASNLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 （卡巴特）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 57	LCDR1	SQGISSD

[0153]

	（乔西亚）	
SEQ ID NO: 58	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3（乔西亚）	YTDESM
SEQ ID NO: 60	LCDR1（IMGT）	QGISSD
SEQ ID NO: 58	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3（IMGT）	QQYTDESMT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAG
SEQ ID NO: 63	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YTDESMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69	DNA 轻链	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCCCTGTCCGCATCCGTG GGCGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCTCACAGGGAATTTCC TCCGACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCGAAG CTGCTGATCTACGCCGCGTCCAACTTGCAATCGGGAGTGCCAAGC CGCTTTTCTGGTTCCGGGAGCGGGACTGACTTCACCCTGACTATT AGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTCGCTACCTACTACTGCCAACAG TACACAGATGAATCCATGACCTTCGGACAGGGCACCAAAGTCGAG ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MOR042596		
SEQ ID NO: 4	HCDR1（组合的）	GYTFTGYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（组合的）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3（组合的）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（卡巴特）	GYHMS
SEQ ID NO: 5	HCDR2（卡巴特）	VINPVSGNTVYAQKFQG
SEQ ID NO: 6	HCDR3	IPSYTYAFDY

[0154]

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 8	HCDR1（乔西亚）	GYTFTGY
SEQ ID NO: 9	HCDR2（乔西亚）	NPVSGN
SEQ ID NO: 6	HCDR3（乔西亚）	IPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 10	HCDR1（IMGT）	GYTFTGYH
SEQ ID NO: 11	HCDR2（IMGT）	INPVSGNT
SEQ ID NO: 12	HCDR3（IMGT）	ARIPSYTYAFDY
SEQ ID NO: 13	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 14	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAACCGGGT GCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT GGTTACCATATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGGATGGGCGTTATCAACCCGGTTTCTGGCAACACGGTTTAC GCGCAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGC ATTAGCACCGCGTATATGGAACTGAGCCGTCTGCGTAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCCGTCTTACACTTACGCT TTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 15	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMSWVRQAPGQGL EWMGVINPVSGNTVYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSED TAVYYCARIPSYTYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 16	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGTGAAAAAACCGGGT GCCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAGCGTCCGGATATACCTTCACT GGTTACCATATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTC GAGTGGATGGGCGTTATCAACCCGGTTTCTGGCAACACGGTTTAC GCGCAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACCAGC ATTAGCACCGCGTATATGGAACTGAGCCGTCTGCGTAGCGAAGAT ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATCCCGTCTTACACTTACGCT TTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCC TCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG

[0155]

		CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （组合的）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （组合的）	RASSLQS
SEQ ID NO: 78	LCDR3 （组合的）	QQHGHSPTT
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （卡巴特）	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （卡巴特）	RASSLQS
SEQ ID NO: 78	LCDR3 （卡巴特）	QQHGHSPTT
SEQ ID NO: 20	LCDR1 （乔西亚）	SQDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （乔西亚）	RAS
SEQ ID NO: 79	LCDR3 （乔西亚）	HGHSPT
SEQ ID NO: 23	LCDR1 （IMGT）	QDISNY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 （IMGT）	RAS
SEQ ID NO: 78	LCDR3 （IMGT）	QQHGHSPTT
SEQ ID NO: 80	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HGHSPTTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 81	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCT AACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACCGTGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAG CATGGTCATTCTCCGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA ATTAAA
SEQ ID NO: 82	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPK LLIYRASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HGHSPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 83	DNA 轻链	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGCGATCGCGTGACCATTACCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCT AACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAA CTATTAATCTACCGTGCTTCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGC CGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT

[0156]

		AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAG CATGGTCATTCTCCGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA ATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC CGGGGCGAGTGT
MOR041877		
SEQ ID NO: 84	HCDR1 （组合的）	GFSLSTSGVGVS
SEQ ID NO: 85	HCDR2 （组合的）	LIFSDHDKIYSTSLKT
SEQ ID NO: 86	HCDR3 （组合的）	TLIDRSVYFDY
SEQ ID NO: 87	HCDR1 （卡巴特）	TSGVGVS
SEQ ID NO: 85	HCDR2 （卡巴特）	LIFSDHDKIYSTSLKT
SEQ ID NO: 86	HCDR3 （卡巴特）	TLIDRSVYFDY
SEQ ID NO: 88	HCDR1 （乔西亚）	GFSLSTSGV
SEQ ID NO: 89	HCDR2 （乔西亚）	FSDHD
SEQ ID NO: 86	HCDR3 （乔西亚）	TLIDRSVYFDY
SEQ ID NO: 90	HCDR1 （IMGT）	GFSLSTSGVG
SEQ ID NO: 91	HCDR2 （IMGT）	IFSDHDK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 （IMGT）	ARTLIDRSVYFDY
SEQ ID NO: 93	VH	QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVSWIRQPPGK ALEWLALIFSDHDKIYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPV DTATYYCARTLIDRSVYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 94	DNA VH	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGTCCGGCGCTGGTGAAACCGACC CAGACCCTGACCCTGACGTGCACCTTTTCCGGATTCAGCCTGTCT ACTTCCGGTGTTGGTGTGAGCTGGATTCGCCAGCCGCCGGGCAAA GCGCTCGAGTGGCTGGCGCTGATCTTCTCTGACCATGACAAGATC TATAGCACCAGCCTGAAAACCCGTCTGACCATTAGCAAAGATACT TCGAAAAACCAGGTGGTGCTGACCATGACCAACATGGACCCGGTG GATACCGCGACCTATTATTGCGCGCGTACTCTGATCGACCGTTCT GTTTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCA
SEQ ID NO: 95	重链	QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVSWIRQPPGK ALEWLALIFSDHDKIYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPV DTATYYCARTLIDRSVYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

[0157]

		DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO: 96	DNA 重链	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGTCCGGCGCTGGTGAAACCGACC CAGACCCTGACCCTGACGTGCACCTTTTCCGGATTCAGCCTGTCT ACTTCCGGTGTTGGTGTGAGCTGGATTCGCCAGCCGCCGGGCAAA GCGCTCGAGTGGCTGGCGCTGATCTTCTCTGACCATGACAAGATC TATAGCACCAGCCTGAAAACCCGTCTGACCATTAGCAAAGATACT TCGAAAAACCAGGTGGTGCTGACCATGACCAACATGGACCCGGTG GATACCGCGACCTATTATTGCGCGCGTACTCTGATCGACCGTTCT GTTTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA
SEQ ID NO: 97	LCDR1（组合的）	SGSSSNIGHHYVS
SEQ ID NO: 98	LCDR2（组合的）	DNTNRPS
SEQ ID NO: 99	LCDR3（组合的）	ATWDGLMNSIV
SEQ ID NO: 97	LCDR1（卡巴特）	SGSSSNIGHHYVS
SEQ ID NO: 98	LCDR2（卡巴特）	DNTNRPS
SEQ ID NO: 99	LCDR3（卡巴特）	ATWDGLMNSIV
SEQ ID NO: 100	LCDR1（乔西亚）	SSSNIGHHY
SEQ ID NO: 101	LCDR2（乔西亚）	DNT
SEQ ID NO: 102	LCDR3（乔西亚）	WDGLMNSI
SEQ ID NO: 103	LCDR1（IMGT）	SSNIGHHY

[0158]

SEQ ID NO: 101	LCDR2（IMGT）	DNT
SEQ ID NO: 99	LCDR3（IMGT）	ATWDGLMNSIV
SEQ ID NO: 104	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGHHYVSWYQQLPGTAP KLLIYDNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCA TWDGLMNSIVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 105	DNA VL	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGC CAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGT CATCATTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCG AAACTGCTGATCTACGACAACACTAACCGCCCGAGCGGCGTGCCG GATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCT ACTTGGGACGGTCTGATGAACTCTATCGTGTTTGGCGGCGGCACG AAGTTAACCGTCCTA
SEQ ID NO: 106	轻链	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGHHYVSWYQQLPGTAP KLLIYDNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCA TWDGLMNSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 107	DNA 轻链	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGGGC CAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGT CATCATTACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCG AAACTGCTGATCTACGACAACACTAACCGCCCGAGCGGCGTGCCG GATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCGCT ACTTGGGACGGTCTGATGAACTCTATCGTGTTTGGCGGCGGCACG AAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACT CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA CTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG GCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACC ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC TATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG GCCCCTACAGAATGTTCA

[0159] 在一些实施例中,hTREM2抗体或其抗原结合片段包含具有表1中所述的任何VH结构域的氨基酸序列的VH结构域。其他合适的hTREM2抗体或其抗原结合片段可以包括已经突变的氨基酸,但在VH结构域中与在表1中描述的序列中描描绘的VH区具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性。在某些实施例中,本披露还提供了特异性结合人TREM2的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有表1中列出的HCDR中的任何一个的氨基酸序列的VH CDR。在具体的实施例中,本发明提供特异性结合人TREM2的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),其包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个具有表1中列出的HCDR中的任何一个的氨基酸序列的VH CDR(或可替代地,由其组成)。

[0160] 在一些实施例中,hTREM2抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有表1中所述的任何VL结构域的氨基酸序列的VL结构域。其他合适的抗人TREM2抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)可包括如下氨基酸,所述氨基酸已经突变但在VL结构域中与表1中描述的序列中描绘的VL区具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性。本公开还提供了特异性结合人TREM2的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),这些抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有表1中列出的LCDR中的任何一个的氨基酸序列的VL CDR。具体地,本发明提供了特异性结合人TREM2的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),这些抗

体或抗体片段包含一个、两个、三个或更多个具有表1中列出的LCDR中的任何一个的氨基酸序列的VL CDR(或可替代地,由其组成)。

[0161] 本文公开的其他抗人TREM2抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包括如下氨基酸,所述氨基酸已经突变但在CDR区中与表1中描述的序列中描绘的CDR区具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施例中,其包括突变氨基酸序列,其中当与表1中描述的序列中描绘的CDR区相比时,CDR区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已经突变。

[0162] 本文还提供了编码特异性结合人TREM2(例如表1中的核酸序列)的抗体及其抗原结合片段的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。此类核酸序列可以针对在预期的宿主细胞例如哺乳动物细胞中的表达进行优化。

[0163] 本文公开的其他抗人TREM2抗体包括如下那些抗体,其中这些氨基酸或编码这些氨基酸的核酸已经突变但与表1中描述的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包括突变氨基酸序列,其中当与表1中描述的序列中描绘的可变区相比时,在可变区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已经突变,但同时基本上保持相同的治疗活性。

[0164] 由于每种提供的抗体与人TREM2结合,因此VH、VL、全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码该氨基酸序列的核苷酸序列)可以是"混合且匹配的"以产生本文披露的其他TREM2结合抗体。可以使用本领域已知的结合测定法(例如,ELISA,实例中描述的测定法)测试这种"混合且匹配的"TREM2结合抗体。当链被混合且匹配时,来自特定VH/VL配对的VH序列应当用结构上相似的VH序列置换。来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应当用结构上相似的全长重链序列置换。来自特定VH/VL配对的VL序列应当用结构上相似的VL序列置换。来自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应当用结构上相似的全长轻链序列置换。

[0165] 因此,在一个实施例中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段具有:重链可变区(VH),其包含选自SEQ ID NO:13和50中任一个的氨基酸序列;和轻链可变区(VL),其包含选自SEQ ID NO:24和61中任一个的氨基酸序列;其中该抗体特异性结合人TREM2。

[0166] 在另一个实施例中,本发明提供了(i)分离的单克隆抗体,该单克隆抗体具有:包含选自SEQ ID NO:15、29、33、35、37、39、52、66、70、72、74、76中任一个的氨基酸序列的全长重链(HC);和包含选自SEQ ID NO:26和63中任一个的氨基酸序列的全长轻链(LC);或(ii)一种包含其抗原结合部分的功能性蛋白。

[0167] 在另一个实施例中,本公开提供了人TREM2结合抗体或其抗体片段,该抗体或其抗体片段包含如表1中所述的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,或其组合。抗体的HCDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:4、7、8、10、41、44、45、47中。抗体的HCDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:5、9、11、42、46、48中。抗体的HCDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:6、12、43、49中。抗体的LCDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:17、20、23、54、57、60中。抗体的LCDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:18、21、55、58中。抗体的LCDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:19、22、56、59、56中。

[0168] 鉴于这些抗体中的每一种都可以与TREM2结合且抗原结合特异性主要由CDR1、

CDR2和CDR3区提供,VH CDR1、CDR2和CDR3序列以及VL CDR1、CDR2和CDR3序列可以是“混合且匹配的”(即,来自不同抗体的CDR可以被混合且匹配),但每种抗体必须含有VH CDR1、CDR2和CDR3以及VL CDR1、CDR2和CDR3以产生本文披露的其他TREM2结合分子。可以使用本领域已知的结合测定和实例中描述的那些结合测定(例如,ELISA)来测试此类“混合且匹配的”TREM2结合抗体。当混合并匹配VH CDR序列时,来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当置换为一种或多种结构上相似的CDR序列。同样,当混合并匹配VL CDR序列时,来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当置换为一种或多种结构上相似的CDR序列。对于普通技术人员来说容易清楚的是,可以通过用来自本文针对本发明单克隆抗体所示的CDR序列的结构相似序列取代一个或多个VH和/或VL CDR区序列来产生新颖的VH和VL序列。

[0169] 因此,本披露提供了一种分离的单克隆抗体或其抗原结合区,该分离的单克隆抗体或其抗原结合区包含:重链CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:4、7、8、10、41、44、45、47组成的组的氨基酸序列;重链CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:5、9、11、42、46和48组成的组的氨基酸序列;重链CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:6、12、43、49组成的组的氨基酸序列;轻链CDR1,其包含选自由SEQ ID NO:17、20、23、54、57、60组成的组的氨基酸序列;轻链CDR2,其包含选自由SEQ ID NO:18、21、55、58组成的组的氨基酸序列;和轻链CDR3,其包含选自由SEQ ID NO:19、22、56、59、56组成的组的氨基酸序列;其中该抗体特异性结合人TREM2。

[0170] 在某些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体是表1中描述的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)。在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体或其抗原结合区包含:重链互补决定区1(HCDR1),其包含SEQ ID NO:4、7、8或10的氨基酸序列;重链互补决定区2(HCDR2),其包含SEQ ID NO:5、9或11的氨基酸序列;重链互补决定区3(HCDR3),其包含SEQ ID NO:6或12的氨基酸序列;轻链互补决定区1(LCDR1),其包含SEQ ID NO:17、20或23的氨基酸序列;轻链互补决定区2(LCDR2),其包含SEQ ID NO:18或21的氨基酸序列;和轻链互补决定区3(LCDR3),其包含SEQ ID NO:19或22的氨基酸序列。

[0171] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体或其抗原结合区包含:HCDR1,其包含SEQ ID NO:41、44、45或47的氨基酸序列;HCDR2,其包含SEQ ID NO:42、46或48的氨基酸序列;HCDR3,其包含SEQ ID NO:43或49的氨基酸序列;LCDR1,其包含SEQ ID NO:54、57或60的氨基酸序列;LCDR2,其包含SEQ ID NO:55或58的氨基酸序列;和LCDR3,其包含SEQ ID NO:56或59的氨基酸序列。

[0172] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体或其抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0173] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体或其抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插

入、缺失或修饰的序列)。

[0174] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0175] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0176] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0177] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0178] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0179] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0180] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0181] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列(或与其具有至少约90%、95%、99%或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨

基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0182] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0183] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0184] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0185] 在一些实施例中,特异性结合人TREM2的抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列),该轻链包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列(或与其具有至少约90％、95％、99％或更高同一性的序列,和/或具有一个、两个、三个或更多个取代、插入、缺失或修饰的序列)。

[0186] 在一些实施例中,本发明提供抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与TREM2蛋白的IgSF结构域以例如通过表面等离子体共振(SPR)测量的以下解离常数(K_D)结合:小于200pM,例如,K_D小于150pM、小于120pM、小于100pM、小于90pM、小于70pM、小于50pM、小于40pM、小于30pM、小于20pM、或小于10pM。在一些优选的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段与TREM2蛋白的IgSF结构域以小于50pM解离常数(K_D)结合。在一些优选的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段与TREM2蛋白的IgSF结构域以小于5pM解离常数(K_D)结合。

[0187] 一旦确定了抗原上的所需表位,就有可能例如使用本发明中所述的技术生成针对该表位的抗体。可替代地,在发现过程中,抗体的产生和表征可以阐明关于所需表位的信息。根据该信息,然后可以竞争性地筛选抗体以结合相同的表位。实现该目的的方法是进行交叉竞争研究以找到彼此竞争性结合的抗体,例如抗体竞争结合抗原。在国际专利申请号WO 2003/48731中描述了基于抗体的交叉竞争将这些抗体“分箱”的高通量方法。表位可包含抗体结合的那些残基。

[0188] 通常,对特定靶抗原有特异性的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中靶抗原上的表位。

[0189] 可以使用本领域公知的任何数量的表位作图技术鉴定包含表位的给定多肽的区域。参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology[分子生

物学方法中的表位映射方案],卷66(Glenn E.Morris,编辑,1996,Humana Press(胡玛纳出版社),托托华(Totowa),新泽西州)。例如,线性表位可以通过例如在固体支持物上同时合成大量肽来确定,所述肽对应于蛋白质分子的部分且肽与抗体反应的同时肽仍然附着于支持物。这些技术在本领域中是已知的并且描述于,例如美国专利号4,708,871;Geysen等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]8:3998-4002;Geysen等人,(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:78-182;Geysen等人,(1986)Mol.Immunol.[分子免疫学]23:709-715。类似地,通过测定氨基酸的空间构象如通过X射线晶体学和二维核磁共振,可以容易地鉴定构象表位。参见例如,Epitope Mapping Protocols[表位作图方案],同上。还可以使用标准抗原性和亲水性图来鉴定蛋白质的抗原区域,如使用例如可从牛津分子集团(Oxford Molecular Group)获得的Omiga 1.0版软件程序计算的那些图。该计算机程序采用Hopp/Woods方法(Hopp等人,(1981)Proc.Natl.Acad.Sci USA[美国国家科学院院刊]78:3824-3828)用于确定抗原性曲线且采用Kyte-Doolittle技术(Kyte等人,(1982)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]157:105-132)用于亲水性图。在一些实施例中,抗TREM2抗体特异性结合人TREM2的IgSF结构域中的表位。例如,抗TREM2抗体可以特异性结合SEQ ID NO:1、2或3中任一个的氨基酸残基19至132内的表位。

[0190] 抗体分子可以是多克隆或单克隆抗体。单克隆抗体可以通过杂交瘤技术或通过其他方法(例如噬菌体展示或组合方法)制备。

[0191] 用于产生抗体的噬菌体展示和组合方法是本领域已知的(如描述在例如,Ladner等人美国专利号5,223,409;Kang等人国际公开号WO 92/18619;Dower等人国际公开号WO 91/17271;Winter等人国际公开WO 92/20791;Markland等人国际公开号WO 92/15679;Breitling等人国际公开WO 93/01288;McCafferty等人国际公开号WO 92/01047;Garrard等人国际公开号WO 92/09690;Ladner等人国际公开号WO 90/02809;Fuchs等人(1991)Bio/Technology[生物技术]9:1370-1372;Hay等人(1992)Hum Antibod Hybridomas[人类抗体杂交瘤]3:81-85;Huse等人(1989)Science[科学]246:1275-1281;Griffths等人(1993)EMBO J[欧洲分子生物学学会杂志]12:725-734;Hawkins等人(1992)JMol Biol[分子生物学杂志]226:889-896;Clackson等人(1991)Nature[自然]352:624-628;Gram等人(1992)PNAS[美国国家科学院院刊]89:3576-3580;Garrad等人(1991)Bio/Technology[生物技术]9:1373-1377;Hoogenboom等人(1991)Nuc Acid Res[核酸研究]19:4133-4137;和Barbas等人(1991)PNAS[美国国家科学院院刊]88:7978-7982)。

[0192] 在一个实施例中,抗体是人抗体(例如,在已经基因工程化为从人免疫球蛋白序列产生抗体的转基因小鼠中制备的抗体),或非人抗体,例如啮齿动物(小鼠或大鼠)、山羊、灵长类动物(例如,猴)、骆驼抗体。

[0193] 可以工程化嵌合和/或人源化抗体以使人患者对非人类受试者中产生的抗体或衍生自非人类抗体基因表达的抗体的免疫应答最小化。嵌合抗体包含非人类动物抗体可变区和人抗体恒定区。此类抗体保留了原始单克隆抗体的表位结合特异性,但当向人施用时可能具有较低的免疫原性,并且因此更可能被患者耐受。例如,小鼠抗体(例如小鼠单克隆抗体)的一条或多条轻链的可变区中的一个或全部(例如,一个、两个或三个)和/或一条或多条重链的可变区中的一个或全部(例如,一个、两个或三个)各自都可以连接到人恒定区,例

如但不限于IgG1人恒定区。嵌合单克隆抗体可通过本领域已知的重组DNA技术产生。例如,编码非人类抗体分子的恒定区的基因可以用编码人恒定区的基因取代(参见Robinson等人,PCT专利申请PCT/US86/02269;Akira等人,欧洲专利申请184,187;或Taniguchi,M.,欧洲专利申请171,496)。另外,可以用于产生嵌合抗体的其他合适技术描述于例如美国专利号4,816,567、4,978,775;4,975,369;和4,816,397。

[0194] 通过用来自人可变区的等效部分替换不参与抗原结合的可变区的部分,可以进一步"人源化"嵌合抗体。人源化抗体包含可变区中的一个或多个人框架区以及重链和/或轻链的非人(例如小鼠、大鼠或仓鼠)互补决定区(CDR)。在一些实施例中,人源化抗体包含除CDR区外的完全人序列。相对于非人源化抗体,人源化抗体通常对人类的免疫原性较低,并且因此在某些情况下提供治疗益处。可以使用本领域已知的方法产生人源化TREM2抗体。参见例如Hwang等人,Methods[方法]36:35,2005;Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]86:10029-10033,1989;Jones等人,Nature[自然]321:522-25,1986;Riechmann等人,Nature[自然]332:323-27,1988;Verhoeyen等人,Science[科学]239:1534-36,1988;Orlandi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]86:3833-3837,1989;美国专利号5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370;以及WO 90/07861。

[0195] 可以使用本领域已知的方法生成人TREM2抗体。例如,人类工程化技术用于将非人抗体转化为工程化人抗体。美国专利公开号20050008625描述了一种体内方法,其用于采用抗体中的人可变区替代非人抗体可变区,同时保持相对于非人抗体的相同结合特征或提供更好的结合特征的体内方法。该方法依赖于表位引导的采用完全人抗体置换非人参考抗体的可变区。得到的人抗体通常与参考非人抗体在结构上不相关,但结合与参考抗体的相同抗原上的相同表位。简而言之,在存在响应测试抗体与抗原的结合的报告系统的情况下,通过在细胞中"竞争物"和参考抗体("测试抗体")的多种杂合体的文库之间建立针对结合有限量的抗原的竞争来实现连续表位引导的互补替代方法。竞争物可以是参考抗体或其衍生物,如单链Fv片段。竞争物也可以是抗原的天然或人工配体,其结合与参考抗体相同的表位。对竞争物的唯一要求是它结合与参考抗体相同的表位,并且它与参考抗体竞争抗原结合。测试抗体具有来自非人参考抗体的一个共同的抗原结合V区,以及从多种来源(如人抗体的文库)中随机选择的另一个V区。来自参考抗体的共同V区用作指导,从而将测试抗体定位在抗原上的相同表位上并且以相同方向定位,使得选择偏向于对参考抗体的最高抗原结合保真度。

[0196] 许多类型的报告系统可用于检测测试抗体与抗原之间的所需的相互作用。例如,互补报告片段可以分别与抗原和测试抗体连接,使得通过片段互补的报告基因激活仅在该测试抗体与该抗原结合时发生。当测试抗体和抗原报告片段融合物与竞争物共表达时,报告基因激活变得依赖于测试抗体与竞争物竞争的能力,该能力与测试抗体对抗原的亲和力成正比。可以使用的其他报告系统包含如美国专利申请号10/208,730(公开号20030198971)中披露的自身抑制的报告基因再激活系统(RAIR)或美国专利申请号10/076,845(公开号20030157579)中披露的竞争激活系统的再激活物。

[0197] 利用连续表位引导的互补替代系统,进行选择以鉴定表达单个测试抗体以及竞争物、抗原和报告组分的细胞。在这些细胞中,每种测试抗体与竞争物一对一竞争结合有限量

的抗原。报告基因的活性与结合至测试抗体的抗原的量成正比,而结合至测试抗体的抗原的量与测试抗体对抗原的亲和力和测试抗体的稳定性成比例。当表达为测试抗体时,测试抗体最初基于其相对于参考抗体的活性进行选择。第一轮选择的结果是一组“杂合”抗体,其中每个抗体由来自参考抗体的相同非人V区和来自文库的人V区组成,并且每个抗体都结合与参考抗体相同的抗原表位。在第一轮中选择的一种或多种杂合抗体具有与参考抗体相当或更高的对抗原的亲和力。

[0198] 在第二V区置换步骤中,在第一步中选择的人V区用作指导,用于选择其余非人参考抗体V区进行多样的同源人V区文库的人置换。在第一轮中选择的杂合抗体也可以用作对于第二轮选择的竞争物。第二轮选择的结果是一组完全人抗体,其在结构上不同于参考抗体,但其与参考抗体竞争结合相同抗原。一些选择的人抗体结合与参考抗体的相同抗原上的相同表位。在这些选择的人抗体中,一种或多种以相当于或比参考抗体的亲和力更高的亲和力与相同表位结合。

[0199] 在一些实施例中,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段结合人TREM2蛋白并促进TREM2依赖性生理活性,例如,增强吞噬作用(例如在hM2A巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞样细胞中,或在脑的小胶质细胞/巨噬细胞中),增强人iPS衍生的小胶质细胞样细胞的趋化性,增加人单核细胞系中的NFAT驱动的报告基因活性,或增加hM2A巨噬细胞中的Syk磷酸化。这种促进和/或增强可以是例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0200] 工程化和修饰的抗体

[0201] 本发明的抗体可以使用具有表1中描述的VH和/或VL序列中的一种或多种的抗体作为起始材料来制备,以将修饰的抗体工程化,该修饰的抗体可以具有与起始抗体相比改变的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内例如在一个或多个CDR区内和/或在一个或多个框架区内的一个或多个残基将抗体工程化。另外或可替代地,可以通过修饰一个或多个恒定区内的残基将抗体工程化,例如从而改变抗体的一个或多个效应子功能。

[0202] 可以进行的一种可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,CDR内的氨基酸序列在各个抗体之间比CDR外部的序列更加多样化。因为CDR序列与大多数抗体-抗原相互作用有关,所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包含被移植在来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的来自所述特定天然存在的抗体的CDR序列(参见例如,Riechmann,L.等人,1998Nature[自然]332:323-327;Jones,P.等人,1986Nature[自然]321:522-525;Queen,C.等人,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.[美国国家科学院院刊]86:10029-10033;Winter的美国专利号5,225,539和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0203] 此类框架序列可以从包含种系抗体基因序列或重新排列的抗体序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(可从因特网www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)中找到,以及在卡巴特,E.A.,等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学相关蛋白质序列],第五版,美国卫生与公众服务部(U.S.Department of Health and Human

Services),NIH公开号91-3242;Tomlinson,I.M.,等人,1992J.fol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,1994Eur.J Immunol.[欧洲免疫学杂志]24:827-836;其中的每一个的内容通过引用明确地并入本文。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列和重新排列的抗体序列可以在“IMGT”数据库(可从因特网www.imgt.org获得;参见Lefranc,M.P.等人,1999Nucleic Acids Res.[核酸研究]27:209-212)中找到;其中的每一个的内容通过引用明确地并入本文)。

[0204] 用于本发明的抗体及其抗原结合片段的框架序列的实例是与本发明的选择的抗体及其抗原结合片段所使用的框架序列在结构上相似的那些序列,例如,共有序列和/或本发明的单克隆抗体使用的框架序列。可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列移植到框架区上,所述框架区具有与框架序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列,或可以将CDR序列移植到与种系序列相比含有一个或多个突变的框架区上。例如,已经发现在某些情况下使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如,Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0205] 另一种类型的可变区修饰是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善感兴趣的抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入一个或多个突变,并且可以在如本文所述且在实例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他感兴趣的功能特性的影响。可以引入保守修饰(如上所讨论的)。所述突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常CDR区内不超过一个、两个、三个、四个或五个残基被改变。

[0206] 可以使用多种抗体/免疫球蛋白框架或支架,只要所得多肽包含至少一个特异性结合TREM2的结合区即可。这种框架或支架包括5种主要独特型的人免疫球蛋白、其抗原结合片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化特征。就这点而言,单个重链抗体如在骆驼科动物中鉴定的那些抗体是特别令人感兴趣的。本领域技术人员将继续发现和开发新的框架、支架和片段。

[0207] 在一个方面,本发明涉及使用非免疫球蛋白支架生成基于非免疫球蛋白的抗体的方法,在所述非免疫球蛋白支架上可以移植本发明的CDR。可以使用已知的或未来的非免疫球蛋白框架和支架,只要它们包含对靶TREM2蛋白有特异性的结合区即可。已知的非免疫球蛋白框架或支架包括但不限于纤连蛋白(化合物治疗剂公司(Compound Therapeutics,Inc.),沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州(Mass.))、锚蛋白(分子配偶体公司(Molecular Partners AG,苏黎世(Zurich),瑞士(Switzerland))、结构域抗体(Domantis,Ltd.,坎布里奇(Cambridge),马萨诸塞州(Mass.),和Ablynx nv,Zwijnaarde,比利时)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG,弗赖辛(Freising),德国)、小型模块化免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc.,西雅图(Seattle),华盛顿州(Wash.))、maxybody(Avidia,Inc.,山景城(Mountain View),加利福尼亚州(Calif.))、蛋白质A(亲合体公司(Affibody AG),瑞典)和affilin(γ-晶体蛋白或泛素)(SciIProteins GmbH,哈雷(Halle),德国)。

[0208] 纤连蛋白支架基于纤连蛋白III型结构域(例如,III型纤连蛋白的第十个模块(10Fn3结构域))。纤连蛋白III型结构域具有分布在两个β片层之间的7或8个β链,它们自身彼此包裹以形成蛋白质的核心且还含有将β链彼此连接且暴露于溶剂中的环(类似于CDR)。在β片层夹心的每个边缘处存在至少三个这样的环,其中所述边缘是垂直于β链方向的蛋白

质的边界(参见美国专利号6,818,418)。这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白,但整体折叠与最小功能性抗体片段(重链可变区)的折叠密切相关,所述最小功能性抗体片段包含骆驼和美洲驼IgG中的完整抗原识别单元。由于这种结构,非免疫球蛋白抗体模拟抗原结合特性,其在特性和亲和力上与抗体的那些抗原结合特性相似。这些支架可用于体外环随机化和改组策略,其类似于体内抗体亲和力成熟的过程。这些基于纤连蛋白的分子可以用作支架,其中可以使用标准克隆技术用本发明的CDR置换分子的环区。

[0209] 骆驼科动物抗体

[0210] 从包括新的世界成员如美洲驼物种(Lama paccos、大羊驼和瘦驼)在内的骆驼和单峰骆驼(双峰骆驼和Calelus dromaderius)家族成员获得的抗体蛋白质已经关于大小、结构复杂性和对于人类受试者的抗原性进行了表征。来自自然界中发现的该哺乳动物家族的某些IgG抗体缺乏轻链,因此在结构上不同于来自其他动物的抗体的具有两条重链和两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的WO 94/04678)。

[0211] 通过基因工程化获得骆驼科动物抗体的区域(它是被鉴定为VHH的小的单个可变结构域)以产生对靶标具有高亲和力的小蛋白质,从而产生称为“骆驼科动物纳米抗体”的低分子量抗体衍生蛋白。参见提交于1998年6月2日的美国专利号5,759,808;还参见Stijlemans,B.等人,2004J Biol Chem[生物化学杂志]279:1256-1261;Dumoulin,M.等人,2003Nature[自然]424:783-788;Pleschberger,M.等人,2003Bioconjugate Chem[生物缀合化学]14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等人,2002Int JCancer[国际癌症杂志]89:456-62;和Lauwereys,M.等人,1998EMBO J[欧洲分子生物学组织杂志]17:3512-3520。骆驼科动物抗体和抗体片段的工程化文库可例如从比利时根特(Ghent)的Ablynx公司商购获得。与非人来源的其他抗体及其抗原结合片段一样,可以重组改变骆驼科动物抗体的氨基酸序列以获得更接近地类似于人序列的序列,即纳米抗体可以是“人源化的”。因此,可以进一步降低骆驼科动物抗体对人的天然低抗原性。

[0212] 骆驼科动物纳米抗体的分子量为人IgG分子的约十分之一,并且该蛋白质的物理直径仅为几纳米。小尺寸的一个结果是骆驼科动物纳米抗体结合抗原位点的能力,所述抗原位点对于较大的抗体蛋白质是功能上不可见的,即,骆驼科动物纳米抗体可用作检测对于使用经典免疫学技术而言隐蔽的抗原的试剂,以及可用作可能的治疗剂。因此,小尺寸的又另一个结果是骆驼科动物纳米抗体可以由于结合靶蛋白的沟槽或狭窄裂缝中的特异性位点而抑制,因此可以具有与经典抗体相比更接近地类似于经典低分子量药物的功能的能力。

[0213] 低分子量和紧凑的尺寸还导致骆驼科动物纳米抗体极其热稳定、对极端pH和蛋白水解消化稳定,并且抗原性差。另一个结果是骆驼科动物纳米抗体容易从循环系统移动到组织中,甚至穿过血脑屏障并且可以治疗影响神经组织的障碍。纳米抗体还可以促进跨越血脑屏障的药物转运。参见2004年8月19日公开的美国专利申请20040161738。这些特征与对人的低抗原性相结合显示了巨大的治疗潜力。此外,这些分子可以在原核细胞如大肠杆菌中完全表达,并且表达为具有噬菌体的融合蛋白并且是功能性的。

[0214] 因此,本发明的特征是对TREM2具有高亲和力的骆驼科动物抗体或纳米抗体。在本文的一个实施例中,骆驼科动物抗体或纳米抗体在骆驼科动物中天然产生,即,在使用对于其他抗体的本文所述的技术用TREM2或其肽片段免疫后,由骆驼科动物产生。可替代地,结

合TREM2的骆驼科动物纳米抗体被工程化,即如本文实例中所述通过以TREM2为靶标使用淘选程序,例如从展现出适当诱变的骆驼科动物纳米抗体蛋白质的噬菌体文库中选择产生。通过基因工程可以进一步定制工程化纳米抗体,以在受体受试者中具有45分钟至两周的半衰期。在一个具体实施例中,骆驼抗体或纳米抗体通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列移植到纳米抗体或单结构域抗体框架序列中而获得,如例如PCT/EP 93/02214中所述。

[0215] 双特异性分子和多价抗体

[0216] 在另一方面,本发明的特征在于包含本发明的TREM2结合抗体或其片段的双特异性或多特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合区可以衍生化或连接至另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体的配体),以生成结合至少两个不同的结合位点或靶分子的双特异性分子。事实上,本发明的抗体可以衍生化或连接至多于一种的其他功能分子,以生成结合多于两个不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这种多特异性分子也旨在由本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为了产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可以功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)至一种或多种其他结合分子,如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。

[0217] 因此,本发明包括双特异性分子,其包含对TREM2的至少一种第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位是不同于第一靶表位的TREM2的另一表位。

[0218] 另外,对于双特异性分子是多特异性的发明,除了第一和第二靶表位之外,所述分子还可以包含第三结合特异性。

[0219] 在一个实施例中,本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段的结合特异性,包括例如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv或单链Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,如Ladner等人的美国专利号4,946,778中所述的Fv或单链构建体。

[0220] 双抗体是二价双特异性分子,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,通过接头连接,所述接头太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对。VH和VL结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger等人,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:6444-6448;Poijak等人,1994Structure[结构]2:1121-1123)。可以通过在相同细胞内表达具有结构VHA-VLB和VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB和VLB-VHA(VL-VH构型)的两条多肽链来产生双抗体。它们中的大多数可以在细菌中以可溶性形式表达。单链双抗体(scDb)通过将两个形成双抗体的多肽链与约15个氨基酸残基的接头连接而产生(参见Holliger和Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学,免疫疗法],45(3-4):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology[免疫技术],2(1):21-36)。scDb可以在细菌中以可溶的活性单体形式表达(参见Holliger和Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学,免疫疗法],45(34):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology[免疫技术],2(1):21-36;Pluckthun和Pack,1997Immunotechnology[免疫技术],3(2):83-105;Ridgway等人,1996Protein Eng.[蛋白质工程],9(7):617-21)。双抗体可以与Fc融合以生成“二-双抗体”(参见Lu等人,2004J.Biol.Chem.[生物化学杂志],279(4):2856-65)。

[0221] 可用于本发明双特异性分子的其他抗体是鼠嵌合和人源化单克隆抗体。

[0222] 本发明的双特异性分子可以通过使用本领域已知的方法缀合组分结合特异性来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异性可以单独生成,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky等人,1984J.Exp.Med.[实验医学杂志]160:1686;Liu,M A等人,1985Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:8648)。其他方法包括Paulus,1985Behring Ins.Mitt.第78期,118-132;Brennan等人,1985Science[科学]229:81-83)和Glennie等人,1987J.Immunol.[免疫学杂志]139:2367-2375)中描述的那些方法。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从Pierce Chemical Co.(罗克福德(Rockford),伊利诺伊州)获得。

[0223] 当结合特异性是抗体时,它们可以通过两条重链的C-末端铰链区的巯基键合而缀合。在具体实施例中,铰链区被修饰为例如在缀合之前含有奇数个巯基残基。

[0224] 可替代地,两种结合特异性可以在相同载体中编码,并在相同宿主细胞中表达和组装。当双特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')2或配体×Fab融合蛋白时,该方法特别有用。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中。

[0225] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或蛋白质印迹测定来证实。这些测定中的每一种通常通过使用对感兴趣的复合物有特异性的标记试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0226] 在另一方面,本发明提供了多价化合物,其包含与TREM2结合的本发明抗体及其抗原结合片段的至少两个相同或不同的抗原结合部分。抗原结合部分可以经由蛋白质融合或共价或非共价连接而连接在一起。可替代地,已经描述了双特异性分子的连接方法。四价化合物可以例如通过将本发明的抗体及其抗原结合片段与结合本发明的抗体及其抗原结合片段的恒定区(例如Fc或铰链区)的抗体或抗原结合片段交联而获得。

[0227] 三聚结构域描述于例如专利EP 1 012 280B1中。五聚模块描述于例如PCT/EP 97/05897中。

[0228] 在一些实施例中,TREM2结合分子是结合TREM2和DAP12的双特异性抗体。在一些实施例中,TREM2结合分子是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。在一些实施例中,第一抗原是人TREM2或其天然存在的变体。在一些实施例中,第二抗原是人DAP12或其天然存在的变体。在一些实施例中,第二抗原是人DAP10或Siglec(结合唾液酸的免疫球蛋白型凝集素)。在一些实施例中,第二抗原是选自以下的致病蛋白:淀粉样蛋白β或其片段、Tau、IAPP、α-突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降钙素、超氧化物

歧化酶、ataxin、路易体、心房利钠因子、胰岛淀粉样多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、催乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、β2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复-相关的非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复肽和脯氨酸-精氨酸(PR)重复肽。在一些实施例中,第二抗原是血脑屏障靶向蛋白,其选自转铁蛋白受体、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体、LRP-1和LRP1;或在免疫细胞上表达的配体和/或蛋白质,其中这些配体和/或蛋白质选自由以下组成的组:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG和磷脂酰丝氨酸。可替代地,第二抗原可以是在一种或多种肿瘤细胞上表达的蛋白质。

[0229] 具有延长的半衰期的抗体

[0230] 本发明提供了特异性结合TREM2并具有延长的体内半衰期的抗体。

[0231] 许多因素可能影响体内蛋白质的半衰期。例如,肾过滤、肝代谢、蛋白水解酶(蛋白酶)降解和免疫原性应答(例如通过抗体中和蛋白质和通过巨噬细胞和树突细胞摄取)。可以使用多种策略来延长本发明的抗体及其抗原结合片段的半衰期。例如,通过与聚乙二醇(PEG)、reCODE PEG、抗体支架、聚唾液酸(PSA)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合配体和碳水化合物屏蔽的化学连接;通过与结合血清蛋白(如白蛋白、IgG、FcRn)的蛋白质的基因融合和转移;通过与结合血清蛋白的其他结合部分(如纳米抗体、Fab、DARPin、avimer、亲合体和anticalin)偶联(遗传地或化学地);通过与rPEG、白蛋白、白蛋白的结构域、白蛋白结合蛋白和Fc的基因融合;或通过掺入纳米载体、缓释配制品或医疗装置中。

[0232] 为了延长体内抗体的血清循环,可以通过PEG与抗体的N-末端或C-末端的位点特异性缀合或经由赖氨酸残基上存在的ε-氨基,将惰性聚合物分子(如高分子量PEG)附接至具有或不具有多功能接头的抗体或其片段。为了使抗体聚乙二醇化,通常在一个或多个PEG基团附接至该抗体或抗体片段的条件下使该抗体、其抗原结合片段与聚乙二醇(PEG)(如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。聚乙二醇化可以通过酰化反应或烷基化反应采用反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)来进行。如本文所用,术语"聚乙二醇"旨在涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在一个实施例中,待聚乙二醇化的抗体是非糖基化抗体。将使用导致最小生物活性损失的直链或支链聚合物衍生化。可以通过SDS-PAGE和质谱法密切监测缀合程度,以确保PEG分子与抗体的适当缀合。可以通过尺寸排阻或通过离子交换色谱法将未反应的PEG与抗体-PEG缀合物分离。可以使用本领域技术人员熟知的方法,例如通过本文所述的免疫测定,测试PEG衍生化抗体的结合活性以及体内功效。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本发明的抗体及其抗原结合片段。参见例如,Nishimura等人的EP 0 154 316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0233] 其他改良的聚乙二醇化技术包括重构化学正交定向工程技术(ReCODE PEG),其经由包含tRNA合成酶和tRNA的重构系统将化学上指定的侧链掺入生物合成蛋白中。该技术能够将超过30个新氨基酸掺入大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中的生物合成蛋白中。tRNA在琥珀密码子所定位的任何位置掺入规范性氨基酸,从而将琥珀从终止密码子转换成发出掺入化学上指定的氨基酸的信号的密码子。

[0234] 重组聚乙二醇化技术(rPEG)也可用于血清半衰期延长。该技术一般包括将300-600个氨基酸非结构化蛋白质尾部与现有的药物蛋白质基因融合。因为这种非结构化蛋白质链的表观分子量比其实际分子量大约15倍,所以蛋白质的血清半衰期大大增加。与需要化学缀合和再纯化的传统PEG化相反,所述制备过程大大简化并且产物是均匀的。

[0235] 聚唾液酸化是另一种技术,它利用天然聚合物聚唾液酸(PSA)来延长活性寿命和提高治疗性肽和蛋白质的稳定性。PSA是唾液酸的聚合物(一种糖)。当用于蛋白质和治疗性肽药物递送时,聚唾液酸在缀合时提供保护性微环境。这增加了治疗性蛋白质在循环中的活性寿命并防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然存在于人体中。它被某些细菌采用,这些细菌已经进化了数百万年以用它来包被其细胞壁。然后,这些天然的聚唾液酸化细菌凭借分子模拟能够阻止身体的防御系统。PSA-大自然的终极秘密技术,可以容易地大量产自这种细菌并具有预定的物理特征。即使与蛋白质偶联,细菌PSA也是完全非免疫原性的,因为它在化学上与人体中的PSA相同。

[0236] 另一种技术包括使用与抗体连接的羟乙基淀粉(“HES”)衍生物。HES是一种源自蜡质玉米淀粉的改性天然聚合物,并可以通过人体的酶代谢。通常施用HES溶液以替代缺乏的血液体积并改善血液的流变学特性。抗体的Hes化能够通过增加分子的稳定性以及通过降低肾清除率来延长循环半衰期,从而导致生物活性增加。通过改变不同的参数如HES的分子量,可以定制多种HES抗体缀合物。

[0237] 还可以生成具有增加的体内半衰期的抗体,其将一个或多个氨基酸修饰(即,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc结构域片段)。参见,例如,国际公开号WO 98/23289;国际公开号WO 97/34631;和美国专利号6,277,375。

[0238] 此外,抗体可以与白蛋白缀合,以使抗体或抗体片段在体内更稳定或在体内具有更长的半衰期。这些技术是本领域中公知的,参见例如,国际公开号WO 93/15199、WO 93/15200和WO 01/77137;和欧洲专利号EP 413,622。

[0239] 增加半衰期的策略尤其可用于纳米抗体、基于纤连蛋白的结合剂以及需要增加体内半衰期的其他抗体或蛋白质。

[0240] 抗体缀合物

[0241] 本发明提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性地结合与异源蛋白质或多肽(或其抗原结合片段,优选与至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、或至少100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(包括共价和非共价缀合)的人TREM2的IgSF结构域以生成融合蛋白。特别地,本发明提供了融合蛋白,其包含本文所述抗体的抗原结合片段(例如,Fab片段、Fd片段、Fv片段、$F(ab)_2$片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)和异源蛋白质、多肽或肽。将蛋白质、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或缀合的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、和5,112,946;欧洲专利号EP 307,434和EP 367,166;国际公开号WO 96/04388和WO 91/06570;Ashkenazi等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:10535-10539;Zheng等人,1995,J.Immunol.[免疫学杂志]154:5590-5600;和Vil等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:11337-11341。

[0242] 可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)

的技术生成另外的融合蛋白。DNA改组可用于改变本发明的抗体及其抗原结合片段的活性(例如,具有更高亲和力和更低解离速率的抗体及其抗原结合片段)。通常参见,美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、和5,837,458;Patten等人,1997,Curr.Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.[生物技术趋势]16(2):76-82;Hansson,等人,1999,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]287:265-76;和Lorenzo和Blasco,1998Biotechniques[生物技术]24(2):308--313(这些专利和出版物中的每一篇均据此通过引用以其全文并入)。抗体及其抗原结合片段或编码的抗体及其抗原结合片段可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变。编码特异性地结合TREM2的IgSF区的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0243] 此外,抗体及其抗原结合片段可以与标志物序列如肽融合以促进纯化。在一个实施例中标志物氨基酸序列是六组氨酸肽,如pQE载体中提供的标签(凯杰公司(QIAGEN,Inc.),伊顿大街(Eton Avenue)9259号,查茨沃思(Chatsworth),加利福尼亚州,91311)等,其中许多是商购可得的。如Gentz等人,1989Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:821-824中所述,例如六组氨酸为纯化融合蛋白提供便利。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于,对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位的血凝素(“HA”)标签(Wilson等人,1984Cell[细胞]37:767)和“FLAG”标签(Hopp等人,Bio/Technology[生物/技术]6(1988):1204-1210)。

[0244] 在一个实施例中,本发明的抗体及其抗原结合片段与诊断剂或可检测剂缀合。这种抗体可用于监测或预后疾病或病症的发作、发展、进展和/或严重程度,其作为临床试验程序(如确定特定疗法的效果)的一部分。这种诊断和检测可以通过将抗体与可检测物质偶联来实现,该可检测物质包括但不限于各种酶,例如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;荧光材料,例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光材料,例如但不限于萤光素酶、萤光素和水母素;放射性物质,例如但不限于碘(131I、125I、123I和121I)、碳(14C)、硫(35S)、氚(3H)、铟(115In、113In、112In和111In)、锝(99Tc)、铊(201Ti)、镓(68Ga、67Ga)、钯(103Pd)、钼(99Mo)、氙(133Xe)、氟(18F)、153Sm、177Lu、159Gd、149Pm、140La、175Yb、166Ho、90Y、47Sc、186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn和117Tin;以及使用多种正电子发射断层扫描的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0245] 此外,抗体或其抗原结合片段可以与治疗部分或药物部分缀合。治疗部分或药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所期望生物活性的蛋白质、肽或多肽。这种蛋白质可包括例如毒素,如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子、α-干扰素、β-干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原活化物、凋亡剂、抗血管生成剂;或生物反应调节剂如淋巴因子。

[0246] 此外,抗体可以与治疗部分如放射性金属离子(如α-发射体,如213Bi)或用于将放

射性金属离子(包括但不限于131In、131LU、131Y、131Ho、131Sm)与多肽缀合的大环螯合剂缀合。在一个实施例中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N",N"'-四乙酸(DOTA),其可以经由接头分子附接至抗体。这种接头分子是本领域公知的,并描述于Denardo等人,1998,Clin Cancer Res.[临床癌症研究]4(10):2483-90;Peterson等人,1999,Bioconjug.Chem.[生物缀合化学]10(4):553-7;和Zimmerman等人,1999,Nucl.Med.Biol.[核医学和生物学]26(8):943-50,这些文献中的每一个均通过引用以其全文并入。

[0247] 用于将治疗部分与抗体缀合的技术是公知的,参见例如,Amon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"[癌症疗法中用于药物免疫靶向的单克隆抗体],在Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症疗法],Reisfeld等人,(编),第243-56页(艾伦丽思出版社公司(Alan R.Liss,Inc.)1985)中;Hellstrom等人,"Antibodies For Drug Delivery[用于药物递送的抗体]",在Controlled Drug Delivery[药物控制释放](第2版)、Robinson等人(编),第623-53页(马塞尔德克尔出版社公司(Marcel Dekker,Inc.)1987)中;Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review[癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体:综述]",在Monoclonal Antibodies[单克隆抗体]84:Biological And Clinical Applications[生物和临床应用]、Pinchera等人(编),第475-506页(1985)中;"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy[放射标记的抗体在癌症疗法中的治疗用途的未来前景]",在Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy[用于癌症检测和治疗的单克隆抗体],Baldwin等人(编),第303-16页(Academic Press[学术出版社]1985)中以及Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.[免疫学综述]62:119-58。

[0248] 抗体也可以附接至固体支持物,这尤其科用于免疫测定或靶抗原的纯化。这种固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0249] 编码抗体的核酸

[0250] 本文还提供的是编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的核酸。此类核酸可以编码包含本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段的区段或结构域的多肽。此类核酸或多核苷酸可编码至少一个CDR区,并且通常编码来自本文所述的hTREM2抗体的重链或轻链的所有三个CDR区。此类核酸或多核苷酸还可以编码本文所述的hTREM2抗体的重链和/或轻链的所有或基本上所有的可变区序列。此类核酸或多核苷酸还可以编码抗体的可变区和恒定区。由于遗传密码的简并性,多种核酸序列将编码免疫球蛋白氨基酸序列中的每一种。例如,本发明的特征在于分别编码选自本文披露的一种或多种抗体的hTREM2抗体或其抗原结合片段的重链和轻链可变区的第一和第二核酸。核酸可以包含如在表1中列出的核苷酸序列或与其基本上相同的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性,或与表1中示出的序列相差不多于3、6、15、30、或45个核苷酸的序列)。核酸可以包含如在表1中列出的一种以上核苷酸序列(例如,轻链可变结构域序列和重链可变结构域序列,或例如轻链序列或重链序列)或与其基本上相同的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性,或与表1中示出的序列相差不多于3、6、15、30、或45个核苷酸的序

列)。

[0251] 在某些实施例中,核酸可以包含编码来自重链可变区的至少一个、两个、或三个CDR或高变环的核苷酸序列,该重链可变区具有如表1中列出的氨基酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列,和/或具有一个或多个取代,例如保守取代的序列)。在其他实施例中,核酸可以包含编码来自轻链可变区的至少一个、两个或三个CDR或高变环的核苷酸序列,该轻链可变区具有如表1中列出的氨基酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列,和/或具有一个或多个取代,例如保守取代的序列)。在又另一个实施例中,核酸可以包含编码来自重链和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个CDR或高变环的核苷酸序列,这些重链和轻链可变区具有如在表1中列出的氨基酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列,和/或具有一个或多个取代,例如保守取代的序列)。

[0252] 在某些实施例中,核酸可以包含编码来自重链可变区的至少一个、两个、或三个CDR或高变环的核苷酸序列,该重链可变区具有如在表1中列出的核苷酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列)。在另一个实施例中,核酸可以包含编码来自轻链可变区的至少一个、两个、或三个CDR或高变环的核苷酸序列,该轻链可变区具有如在表1中列出的核苷酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列)。在某些实施例中,核酸可以包含编码来自重链和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR或高变环的核苷酸序列,该重链和轻链可变区具有如在表1中列出的核苷酸序列,或与其基本上同源的序列(例如,与其具有至少约85%、90%、95%、或99%序列同一性的序列)。

[0253] 多核苷酸序列可以通过从头合成(例如固相DNA合成)或通过编码hTREM2抗体或其抗原结合片段的现有序列的PCR诱变来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,例如Narang等人,1979,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90);Brown等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109,1979的磷酸二酯方法;Beaucage等人,Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺方法;和美国专利号4,458,066的固体支持方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如以下文献中所述进行,例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:用于DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),弗里曼出版社,纽约,纽约州(Freeman Press,NY,N.Y.),1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人,(编辑),学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州(Academic Press,San Diego,Calif.),1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967,1991;以及Eckert等人,PCR Methods and Applications[PCR方法和应用]1:17,1991。

[0254] 本文还提供了载体(例如,表达载体),该载体包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段的区段或结构域。此类载体可用于表达和/或产生或影响hTREM2抗体或抗原结合片段(例如,如本文所述)的表达,例如,离体地细胞内或体内地细胞内的表达,例如在生物体中的一个或多个目标组织中。可以使用各种表达载体来表达编码hTREM2抗体或其结合片段的多核苷酸。基于病毒的和非病毒表达载体均可用于在细胞例如哺乳动物细胞中产生抗体或其片段。非病毒载体和系统包括质粒、附加型载体

(典型地具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)以及人类人工染色体(参见例如,Harrington等人,Nat Genet.[自然遗传学]15:345,1997)。可以使用本领域已知的转染或转导方法(例如,使用脂质(例如脂质体转染)、电穿孔、机械细胞膜变形等)将这些非病毒载体递送至目标细胞。术语“表达载体”是指可插入所希望的编码序列用于引入可以表达它的细胞中的载体核酸分子。载体可以是DNA载体、RNA载体、质粒、粘粒、或病毒载体、或人工染色体(参见,例如,Harrington等人,Nat Genet[自然遗传学]15:345,1997)。例如,用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达hTREM2抗体或其抗原结合片段的非病毒载体包括pThioHis A、B和C;pcDNA3.1/His;pEBVHis A、B和C(英杰公司(Invitrogen),圣地亚哥(San Diego),加利福尼亚州(Calif.));MPSV载体;以及本领域已知的用于表达蛋白质的许多其他载体。例如,一类载体利用衍生自动物病毒的DNA元件,例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录酶病毒(劳氏肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用衍生自RNA病毒的RNA元件,例如塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、东部马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis virus)和黄病毒。有用的病毒载体包括基于以下病毒中任一种的载体:逆转录酶病毒(例如慢病毒)、慢病毒腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒(HSV))、基于SV40的载体、乳头状瘤病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、牛痘病毒、辛德毕斯(Sinbis)病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒(NDV)、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、塞内卡谷病毒(Seneca Valley virus)、柯萨奇病毒、肠病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒(maraba virus)、或塞姆利基森林病毒(SFV)。参见,Brent等人,同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[微生物学年度评论]49:807,1995;和Rosenfeld等人,Cell[细胞]68:143,1992。

[0255] 在一些实施例中,载体是逆转录病毒载体。在一些实施例中,载体是慢病毒载体。衍生自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体相对于衍生自肿瘤逆转录病毒如鼠白血病病毒的载体具有附加优点,因为它们可以转导非增殖性细胞,例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的附加优点。逆转录病毒载体还可以是例如γ逆转录病毒载体。γ逆转录病毒载体可以包括例如启动子、包装信号(ψ)、引物结合位点(PBS)、一个或多个(例如两个)长末端重复(LTR)序列、和感兴趣的转基因(例如编码CAR的基因)。γ逆转录病毒载体可能缺少病毒结构基因(如gag、pol、和env)。示例性γ逆转录病毒载体包括鼠白血病病毒(MLV)、形成脾脏病灶病毒(SFFV)、和骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV),以及由其衍生的载体。其他γ逆转录病毒载体描述于例如Tobias Maetzig等人,“Gammaretroviral Vectors:Biology,Technology and Application[γ逆转录病毒载体:生物学/技术和应用]”Viruses.[病毒]2011年6月;3(6):677-713)。

[0256] 在一些实施例中,载体是腺相关病毒(AAV)载体,例如,重组AAV(rAAV)载体。“AAV”是腺相关病毒的缩写,可用于指病毒本身或其衍生物。该术语涵盖所有亚型以及天然存在的和重组的形式,除非另有要求。缩写“rAAV”是指重组腺相关病毒,也称为重组AAV载体(或“rAAV载体”)。术语“AAV”包括例如,AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、AAV 9型(AAV9)、AAV 10型(AAV10,包括AAVrh10)、AAV 12型(AAV12)、鸟AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、和绵羊AAV。“灵长类AAV”是指感染灵长类的AAV,“非灵长类AAV”是

指感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛AAV”是指感染牛哺乳动物的AAV,等。

[0257] 各种血清型AAV的基因组序列,以及天然反向末端重复(ITR)序列,Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。此类序列可以在文献中或在诸如GenBank的公共数据库中找到。参见,例如,GenBank登录号NC-002077(AAV1)、AF063497(AAV1)、NC-001401(AAV2)、AF043303(AAV2)、NC-001729(AAV3)、NC-001829(AAV4)、U89790(AAV4)、NC-006152(AAV5)、AF513851(AAV7)、AF513852(AAV8)、和NC-006261(AAV8);或在例如WO 2005033321(AAV1-9)的出版物中,其披露的内容通过引用结合在此。还参见,例如,Srivistava等人,(1983)J.Virology[病毒学杂志]45:555;Chiorini等人,(1998)J.Virology[病毒学杂志]71:6823;Chiorini等人,(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:1309;Bantel-Schaal等人,(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:939;Xiao等人,(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:3994;Muramatsu等人,(1996)Virology[病毒学]221:208;Shade等人,(1986)J.Virol.[病毒学杂志]58:921;Gao等人,(2002)Proc.Nat.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]99:11854;Moris等人,(2004)Virology[病毒学]33:375-383;国际专利公开WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244;以及美国专利号6,156,303。

[0258] 如本文所用的“rAAV载体”是指包含非AAV来源的多核苷酸序列(即,与AAV异源的多核苷酸)的AAV载体,所述多核苷酸序列通常是用于细胞遗传转化的目的序列。在一些实施例中,异源多核苷酸可以侧接至少一个(有时两个)AAV反向末端重复(ITR)序列。术语rAAV载体包括rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒。rAAV载体可以是单链(ssAAV)或自身互补序列(scAAV)。“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白质(通常由一种或多种野生型AAV的所有衣壳蛋白或衍生自一种或多种野生型AAV的衣壳蛋白构成)和包封的多核苷酸rAAV载体构成的病毒颗粒。如果该颗粒包含异源多核苷酸(即,除了野生型AAV基因组之外的多核苷酸,例如待递送至哺乳动物细胞的转基因),则其通常被称为“rAAV载体颗粒”或简称为“rAAV载体”。因此,rAAV颗粒的产生必然包括rAAV载体的产生,因为这样的载体包含在rAAV颗粒内。

[0259] 在一些实施例中,载体可以是重组DNA分子,其包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段的核酸,例如如本文所述。如本文所用的“重组”是指载体、多核苷酸、多肽或细胞是克隆;限制或连接步骤;和/或导致与自然界中发现的产物不同的构建体的其他过程的各种组合的产物(例如,涉及其中包含的多核苷酸或多肽)。重组病毒或载体是包含重组多核苷酸的病毒颗粒。该术语分别包括原始多核苷酸构建体的复制和原始病毒构建体的重复。

[0260] 重组载体通常包括与待表达的核酸序列可操作地连接的一个或多个调节序列。术语“调节序列”包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。调节序列包括指导核苷酸序列的组成型表达的序列,以及组织特异性调节和/或诱导序列。表达载体还可包括设计用于优化信使RNA稳定性和宿主细胞中可翻译性的元件,和/或用于建立表达hTREM2抗体或其抗原结合(例如,如本文所述)的永久性稳定细胞克隆的药物选择标志物。表达载体的设计可以取决于诸如以下的这样的因素:待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等。用于生成这样的重组表达载体的通用方法可以在以下文献中发现:Sambrook和Russell编辑.(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版;Ausubel等人编辑系列(2007年更新至2010年)Current Protocols in Molecular Biology[当代分子生物学实验指南],以及本领域已知的其他方法。

[0261] 特定的起始信号也可能需要编码序列的有效翻译。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所希望的编码序列的阅读框“同框(in-frame)”以便确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件可以提高表达效率。

[0262] 表达可以使用本领域已知的任何合适的宿主细胞,例如,哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。原核和真核表达系统都是广泛可用的。在一些实施例中,该表达系统是哺乳动物细胞表达,例如CHO细胞表达系统。在一些实施例中,可以对核酸进行密码子优化以促进在期望的宿主细胞中表达。重要的是使用启动子和/或增强子,该启动子和/或增强子有效指导DNA区段在选择用于表达的细胞类型、细胞器和生物体中的表达。分子生物学领域中的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的用途,例如,参见Sambrook等人,(2001)。

[0263] 大多数转录的真核RNA分子将经历RNA剪接以从初级转录物中去除内含子。含有基因组真核生物序列的载体可能需要供体和/或受体剪接位点以确保用于蛋白质表达的转录物的正确加工(参见Chandler等人,1997,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],94(8):3596-601)。

[0264] 本披露的载体或构建体通常包含至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”由参与RNA聚合酶特异性终止RNA转录物的DNA序列组成。因此,在某些实施例中,考虑了终止RNA转录物产生的终止信号。体内可能需要终止子以达到所需的信息水平。在真核系统中,终止子区还可以包含特定的DNA序列,该序列允许新转录物的位点特异性切割,从而暴露聚腺苷酸化位点。这表示专门的内源聚合酶在转录物的3’末端添加一段约200A残基(聚A)。用这种聚A尾修饰的RNA分子似乎更稳定并且更有效地翻译。因此,在涉及真核生物的其他实施例中,优选终止子包含用于切割RNA的信号,并且更优选的是终止子信号促进信息的聚腺苷酸化。终止子和/或聚腺苷酸化位点元件可用于增强信息水平和/或使从盒到其他序列的读数最小化。预期用于本披露的终止子包括本文所述或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,包括但不限于,例如,基因的终止序列(例如像牛生长激素终止子)或病毒终止序列(例如SV40终止子)。在某些实施例中,终止信号可以是缺乏可转录或可翻译的序列,例如由于序列截短。

[0265] 在表达中,特别是真核表达中,通常将包括聚腺苷酸化信号以实现转录物的适当聚腺苷酸化。不认为聚腺苷酸化信号的性质对于本披露的成功实践是至关重要的,和/或可以采用任何这样的序列。优选的实施例包括方便和/或已知在各种靶细胞中良好地起作用的SV40聚腺苷酸化信号和/或牛生长激素聚腺苷酸化信号。聚腺苷酸化可以增加转录物的稳定性或可以促进细胞质转运。

[0266] 为了在宿主细胞中繁殖载体,它可以含有一个或多个复制位点起点(通常称为“ori”),该复制位点起点是复制启动的特定核酸序列。可替代地,如果宿主细胞是酵母,则可以使用自主复制序列(ARS)。

[0267] 在本披露的某些实施例中,可以通过在表达载体中包括标志物在体外或体内鉴定含有本披露的核酸构建体的细胞。此类标志物将赋予细胞可鉴定的变化,从而允许容易地鉴定含有表达载体的细胞。通常,可选择标志物是赋予允许选择的属性的标志物。阳性可选

择标志物是其中标志物的存在允许其选择的标志物,而阴性可选择标志物是其存在阻止其选择的标志物。阳性可选择标志物的实例是抗药性标志物。

[0268] 通常,包含药物选择标志物有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博莱霉素和组氨醇的抗性的基因是有用的选择标志物。除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标志物之外,还考虑了其他类型的标志物,包括可筛选的标志物(例如GFP),该标志物是基于比色分析。可替代地,可以使用可筛选的酶,如单纯疱疹病毒的胸苷激酶(HSV-tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将知道可能结合FACS分析如何使用免疫标志物。所使用的标志物不被认为是重要的,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。可选择和可筛选的标志物的其他实例是本领域技术人员公知的。

[0269] 表达载体的选择取决于其中要表达载体的一种或多种组分的预期细胞。通常,载体含有一个或多个调节序列,例如启动子和其他调节序列(例如增强子),其与编码hTREM2抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可操作地连接。

[0270] “启动子”是作为核酸序列的区域的控制序列,在该区域处控制转录的起始和速率。它可能含有遗传元件,在这些元件上调节蛋白质和分子可能结合如RNA聚合酶和其他转录因子。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“受控制”和“受转录控制”意指启动子处于与核酸序列相关的正确功能位置和/或方向以控制转录起始和/或该序列的表达。可以将启动子与“增强子”结合或不结合使用,该“增强子”是指参与核酸序列转录活化的顺式作用调节序列。

[0271] 启动子可以是与基因或序列天然相关的启动子,如可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5'非编码序列而获得。这样的启动子可以被称为“内源的”。类似地,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于该序列的下游或上游。可替代地,通过将编码核酸区段定位在重组或异源启动子的控制下,将获得某些优点,所述重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子还指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。此类启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子,以及从任何其他原核、病毒或真核细胞分离的启动子或增强子,以及非“天然存在的”启动子或增强子,即含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列之外,可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术(例如PCR)结合本文公开的组合物产生序列(参见US 4683202,US 5928906)。此外,预期也可以使用在非核细胞器(如线粒体,叶绿体等)中指导转录和/或序列表达的控制序列。

[0272] 所用的启动子可以是组成型的、诱导型的、合成的、组织或细胞特异性的、和/或在适当的条件下用于指导所引入的DNA区段的高水平表达是有用的,例如有利于大规模生产重组蛋白和/或肽。另外,还可以掺入其他调节元件以改善编码结合人TREM2蛋白(即hTREM2)的抗体的核酸表达,例如增强子、核糖体结合位点、转录终止序列等。

[0273] 在一些实施例中,组成型启动子用于提供hTREM2抗体或其抗原结合片段的恒定表达。组成型启动子的实例包括但不限于即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)序列启动子、MoMuLV启动子、禽类白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒即时早期启动子、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)启动子、以及人基因启动子,如但不限于肌动蛋

白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1α启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。

[0274] 在一个实施例中,除诱导条件外,使用诱导型启动子来阻止插入序列的表达。诱导型启动子的使用提供了分子开关,该分子开关能够当需要该启动子可操作地连接的多核苷酸序列的表达时启动这种表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子,a。

[0275] 诱导型启动子包括但不限于例如阿拉伯糖启动子、lacZ启动子、四环素启动子、金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子或热休克启动子。

[0276] 除了启动子之外,还可能需要或期望其他调节元件以有效表达hTREM2抗体或其抗原结合片段。这些元件包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0277] 在一些实施例中,组织或细胞特异性启动子用于仅在特定组织或细胞中提供hTREM2抗体或其抗原结合片段的表达。组织或细胞特异性启动子或元件的特性以及表征其活性的测定法是本领域技术人员熟知的。实例包括人LIMK2基因(Nomoto等人,1999,Gene[基因],236(2):259-271)、生长激素抑制素受体2基因(Kraus等人,1998,FEES Lett.[FEES快报],428(3):165-170)、鼠科动物附睾视黄酸-结合基因(Lareyre等人,1999,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],274(12):8282-8290)、人CD4(Zhao-Emonet等人,1998,Biochirn.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报],1442(2-3):109-119)、小鼠α2(XI)胶原(Tsumaki,等人,1998,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],273(36):22861-22864)、D1A多巴胺受体基因(Lee,等人,1997,J.Auton.Nerv.Syst.[自主神经系统杂志],74(2-3):86-90)、胰岛素样生长因子II(Wu等人,1997,Biochem.Biophys.Res.Commun.[生物化学与生物物理研究通讯],233(1):221-226)、人血小板内皮细胞粘附分子-1(Almendro等人,1996,J.Immunol.[免疫学杂志],157(12):5411-5421)、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子(Wang等人,Gene Ther.[基因治疗]2008年11月;15(22):1489-99)。

[0278] 在一些实施例中,合成型启动子用于提供hTREM2抗体或其抗原结合片段的表达。合成型启动子可以显著超过天然启动子的转录效力。例如,可以选择不被内源性细胞机器或因子关闭或降低活性的合成型启动子。可以将其他元件(包括反式作用因子结合位点和增强子)插入合成型启动子中以提高转录效率。合成型启动子可以被合理设计和化学合成,以结合合成型和生物型启动子的最佳特征。将合成的寡核苷酸退火并通过若干过程连接以产生全长化学合成的启动子。合成型启动子可以是诱导型或细胞型特异性启动子。

[0279] 在优选的实施例中,载体是腺相关载体(AAV)。在实施例中,AAV载体包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸。在典型的实施例中,AAV载体包含编码hTREM2抗体或其结合片段的多核苷酸,该多核苷酸在一侧或两侧侧接反向末端重复(ITR)序列。多核苷酸可另外包含一种或多种另外的元件,例如启动子、增强子、一个或多个内含子序列聚(A)序列及其组合。在一些实施例中,载体包含多核苷酸AAV载体质粒,该多核苷酸AAV载体质粒包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的包封在AAV衣壳中的多核苷酸。

[0280] 在一些实施例中,载体包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的与至少一个靶细胞相容的调节序列(例如启动子)可操作地连接的多核苷酸。

[0281] 在一些实施例中,AAV载体中的ITR衍生自相同的AAV血清型。在一些实施例中,AAV载体中的ITR衍生自不同的AAV血清型。在一些实施例中,AAV颗粒中的ITR是相同的。在实施例中,AAV颗粒中的ITR是不同的。

[0282] 在一些实施例中,AAV载体中的ITR衍生自与AAV衣壳相同的AAV血清型。在实施例中,AAV载体中的ITR衍生自不同于AAV衣壳的血清型的血清型。在一个实施例中,ITR衍生自AAV2,并且AAV衣壳衍生自除AAV2之外的血清型,例如AAV9。

[0283] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以与由插入的hTREM2抗体或其抗原结合片段序列编码的多肽形成融合蛋白。更常见的是,插入的hTREM2抗体或其抗原结合片段的序列在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码hTREM2抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这种载体允许可变区表达为具有恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整抗体及其抗原结合片段。典型地,此类恒定区是人类的。

[0284] 表达载体的产生可利用包含多克隆位点(MCS)的载体,该多克隆位点是含有多个限制酶位点的核酸区域,可以将其中任何一个与标准重组技术结合使用以消化载体。参加Carbonelli等人,1999,Levenson等人,1998,和Cocea,1997。“限制性内切酶消化”是指用仅在核酸分子中的特定位置起作用的酶催化切割核酸分子。这些限制性内切酶中的许多是可商购的。本领域技术人员广泛理解这些酶的用途。通常,使用在MCS内切割的限制性内切酶使载体线性化或片段化,以使外源序列与载体连接。“连接”是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程,这两个核酸片段可以彼此邻接或不邻接。涉及限制性内切酶和连接反应的技术是重组技术领域的技术人员所熟知的。

[0285] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主(通常参见Sambrook等人,同上)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法/基因枪、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合物、药剂增强的DNA摄取、离体转导、原生质体融合、逆转录转导、病毒转染、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下,使细胞在培养基中生长并筛选适当的活性。对于重组蛋白的长期高产量生产,通常期望稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和可选择标志物基因的表达载体来制备稳定表达多肽的细胞系。在引入载体后,可以使细胞在富集培养基中生长1-2天,然后将它们转换为选择性培养基。选择性标志物的目的是赋予选择抗性,并且它的存在允许在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性、稳定转染的细胞。用于培养所得的转染细胞和回收产生的抗体的方法和条件是本领域技术人员已知的,并且可以根据基于本说明书中所用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞进行改变或优化。

[0286] 本文还提供了包含本文所述的任何一种表达载体的细胞。在一些实施例中,本披露内容的特征在于包括本文所述的核酸分子的宿主细胞。这些细胞可以是宿主细胞或治疗细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换地使用,其不仅是指特定的受试细胞,而且指这种细胞的后代或潜在后代。因为某些变化可在后代中由于突变或环境影响

而发生,这种子代可能在事实上与亲代细胞不同,但是仍然包括在如在此使用的术语范围内。

[0287] 在一个实施例中,这些宿主细胞被基因工程化以包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段的核酸。在一个实施例中,通过使用表达盒使宿主细胞基因工程化。短语“表达盒”是指核苷酸序列,其能够影响在与此类序列相容的宿主中的基因的表达。此类盒可以包括启动子,具有或不具有内含子的开放阅读框和终止信号。还可以使用在实现表达中必需或有帮助的其他因子,例如诱导型启动子。

[0288] 用于包含和表达hTREM2抗体或其抗原结合片段的链的宿主细胞可以是但不限于真核细胞或原核细胞,例如细菌细胞、昆虫细胞或人细胞。大肠杆菌是一种可用于克隆并表达本发明多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(如枯草杆菌)和其他肠杆菌科(如沙门氏菌属、沙雷氏菌属)以及各种假单胞菌属的种。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制的起点)。此外,将存在任何数量的多种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、β-内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体λ的启动子系统。启动子典型地任选使用操纵基因序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物如酵母也可用于表达本发明的hTREM2抗体或其抗原结合片段。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。合适的昆虫细胞包括,但不限于Sf9细胞。

[0289] 在一个实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本发明的hTREM2抗体或其抗原结合片段。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,1D6.C9骨髓瘤杂交瘤细胞)或含有外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常的必死或正常或异常的永生的动物或人类细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。利用哺乳动物组织细胞培养表达多肽一般在例如Winnacker,FROM GENES TO CLONES[从基因到克隆],VCH出版商,纽约,纽约州,1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列如复制的起点、启动子和增强子(参见例如,Queen,等人,Immunol.Rev.[免疫学评论]89:49-68,1986)和必要的处理信息位点如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或衍生自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP pol III启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人类即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0290] 宿主细胞可用于产生或表达结合人TREM2蛋白(即hTREM2)的抗体。因此,本披露的特征还在于用于使用宿主细胞产生hTREM2抗体或其抗原结合片段的方法。在一个实施例中,该方法包括在合适的培养基中培养宿主细胞(其中已经引入编码抗体的重组表达载体),从而产生hTREM2抗体或其抗原结合片段。在另一个实施例中,该方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离抗体。合适的真核细胞包括,但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞、和MDCKII细胞。用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处

理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等人,同上)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合物(Elliot和O'Hare,Cell[细胞]88:223,1997)、药剂增强的DNA摄取和离体转导。对于重组蛋白的长期高产量生产,通常期望稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和选择性标志物基因的本发明表达载体来制备稳定表达hTREM2抗体链或抗原结合片段的细胞系。在引入载体后,可以使细胞在富集培养基中生长1-2天,然后将它们转换为选择性培养基。选择性标志物的目的是赋予选择抗性,并且它的存在允许在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性、稳定转染的细胞。

[0291] 调节序列

[0292] 本领域技术人员可以认识到,靶细胞中载体的一种或多种组分的表达可能需要调节序列。

[0293] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含有效表达hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的调节序列。

[0294] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含有效驱动被靶向的细胞中的表达的调节序列。

[0295] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含调节序列,例如但不限于启动子。作为非限制性实例,启动子可以是(1)CMV启动子,(2)CBA启动子,(3)FRDA或FXN启动子,(4)UBC启动子,(5)GUSB启动子,(6)NSE启动子,(7)突触蛋白启动子,(8)MeCP2启动子,(9)GFAP启动子,(10)HI启动子,(11)U6启动子,(12)NFL启动子,(13)NFH启动子,(14)SCN8A启动子,或(15)PGK启动子。

[0296] 启动子

[0297] 本领域技术人员可以认识到,靶细胞中hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的表达可能需要特定启动子,包括但不限于物种特异性启动子、诱导型启动子、组织特异性启动子或细胞周期特异性启动子(Parr等人,Nat.Med.[自然医药]3:1145-9(1997);其内容通过引用整体并入本文中)。

[0298] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含有效表达hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的启动子。

[0299] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含有效驱动被靶向的细胞中的表达的启动子。

[0300] 在一个实施例中,启动子提供hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)在靶组织(例如但不限于神经系统组织)中表达一段时间。hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的表达可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2周、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3周、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30

年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年、55年、60年、65年、或多于65年的时间段。hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的表达可以持续1-5小时、1-12小时、1-2天、1-5天、1-2周、1-3周、1-4周、1-2个月、1-4个月、1-6个月、2-6个月、3-6个月、3-9个月、4-8个月、6-12个月、1-2年、1-5年、2-5年、3-6年、3-8年、4-8年或5-10年或10-15年、或15-20年、或20-25年、或25-30年、或30-35年、或35-40年、或40-45年、或45-50年、或50-55年、或55-60年、或60-65年。

[0301] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含位于编码的hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的第一外显子上游约5kb的区域;更具体地,存在位于编码的共济蛋白基因的第一外显子上游约4.9kb的17-bp区域,以允许用FRDA启动子表达(参见例如Puspasari等人Long Range Regulation of Human FXN Gene Expression[人FXN基因表达的长程调控],PLOS ONE,2011;其内容通过引用整体并入本文中)。

[0302] 在一个实施例中,启动子小于1kb。启动子可以具有200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或大于800的长度。启动子可以具有在200-300之间、200-400之间、200-500之间、200-600之间、200-700之间、200-800之间、300-400之间、300-500之间、300-600之间、300-700之间、300-800之间、400-500之间、400-600之间、400-700之间、400-800之间、500-600之间、500-700之间、500-800之间、600-700之间、600-800之间、或700-800之间的长度。

[0303] 在一个实施例中,启动子可以是相同或不同启动子(例如但不限于CMV和CBA)的两个或更多个组分、区域或序列的组合。每个组分可以具有200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或800以上的长度。每个组分可以具有在200-300之间、200-400之间、200-500之间、200-600之间、200-700之间、200-800之间、300-400之间、300-500之间、300-600之间、300-700之间、300-800之间、400-500之间、400-600之间、400-700之间、400-800之间、500-600之间、500-700之间、500-800之间、600-700之间、600-800之间、或700-800之间的长度。

[0304] 在一个实施例中,启动子是CMV增强子序列(例如即时/早期CMV增强子序列(例如382-核苷酸CMV-增强子序列))和鸡β-肌动蛋白(CBA)-启动子序列(例如260个核苷酸的CBA启动子序列)的组合。

[0305] 在一个实施例中,启动子是CMV增强子序列的280个核苷酸的片段和鸡β-肌动蛋白(CBA)-启动子序列的266个核苷酸的片段的组合。在一些实施例中,CMV增强子序列包含以下,例如由以下组成:cgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcccattgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgtcaatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatgccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca

ttatgcccagtacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct ac

[0306] (SEQ ID NO:134)

[0307] 在一些实施例中,CBA启动子序列包含以下,例如由以下组成:cc acgttctgct tcactctccc catctccccc ccctccccac ccccaatttt gtatttatttatttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggggcg cgcgccaggcggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaatcagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc ggcggcggcg gcggccctataaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcg

[0308] (SEQ ID NO:135)

[0309] 在一个实施例中,AAV载体包含杂合CMV增强子/鸡β肌动蛋白启动子,其包含以下序列,例如由以下序列组成:

[0310] cgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca

[0311] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt

[0312] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg

[0313] ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag

[0314] tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct actcgaggcc acgttctgct

[0315] tcactctccc catctccccc ccctccccac ccccaatttt gtatttattt atttttaat

[0316] tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc

[0317] ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg

[0318] cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc ggcggcggcg gcggccctat aaaaagcgaa

[0319] gcgcgcggcg ggcg

[0320] (SEQ ID NO:136)

[0321] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含遍在启动子。遍在启动子的非限制性实例包括CMV、CBA(包括衍生物CAG,CBh等)、EF-1a、PGK、UBC、GUSB(hGBp)和UCOE(HNRPA2B1-CBX3的启动子)。在一个实施例中,Yu、Soderblom、Gill、Husain、Passini、Xu、Drews或Raymond教导的任何启动子都可用于本发明。Yu等人(Molecular Pain 2011,7:63;其内容通过引用整体并入本文中)使用慢病毒载体评估了在大鼠DRG细胞和原代DRG细胞中CAG、EF-1a、PGK和UBC启动子下eGFP的表达并且发现UBC表现出比其他3个启动子更弱的表达,并且对于所有启动子仅观察到10%-12%的神经胶质表达。

[0322] Soderblom等人(E.Neuro 2015;其内容通过引用整体并入本文)评估了在运动皮质中注射后在用CMV和UBC启动子的AAV8中的eGFP和在用CMV启动子的AAV2中的eGFP的表达。鼻内施用含有UBC或EF-1a启动子的质粒显示出持续的气道表达大于用CMV启动子的表达(参见例如,Gill等人,Gene Therapy[基因治疗]2001,第8卷,1539-1546;其内容通过引用整体并入本文中)。Husain等人(Gene Therapy[基因治疗]2009;其内容通过引用整体并入本文中)评估了具有hGUSB启动子、HSV-1LAT启动子和NSE启动子的HβH构建体,并且发现HβH构建体在小鼠脑中表现出比NSE更弱的表达。Passini和Wolfe(J.Virol.[病毒学杂志]2001,12382-12392,其内容通过引用整体并入本文中)评估了新生小鼠中脑室内注射后HβH载体的长期作用,并发现持续表达至少1年。Xu等人发现当与CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE+wpre、NSE(0.3kb)、NSE(1.8kb)和NSE(1.8kb+wpre)相比较使用NF-L and NF-H时在所有大区域中的低表达(Gene Therapy[基因治疗]2001,8,1323-1332;其内

容通过引用整体并入本文中)。Xu等人发现启动子活性按降序排列为NSE(1.8kb)、EF、NSE(0.3kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL和NFH。NFL是650个核苷酸的启动子,NFH是920个核苷酸的启动子,它们都不存在于肝脏中,但NFH在感觉本体感受神经元、脑和脊髓中是丰富的,并且NFH存在于心脏中。SCN8A是470个核苷酸的启动子,其在整个DRG、脊髓和脑中表达,其中在海马神经元和小脑浦肯野细胞、皮质、丘脑和下丘脑中具有特别高的表达(参见例如Drews等人Identification of evolutionary conserved,functional noncoding elements in the promoter region of the sodium channel gene SCN8A[鉴定钠通道基因SCN8A的启动子区域中的进化保守的功能性非编码元件],Mamm Genome[哺乳动物基因组](2007)18:723-731;和Raymond等人Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel a-subunit genes[可变剪接的钠通道α-亚基基因的表达],Journal of Biological Chemistry[生物化学杂志](2004)279(44)46234-4624;其各自的内容通过引用整体并入本文中)。

[0323] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含非细胞特异性的启动子。在一个实施例中,启动子是弱启动子(根据其亲和力和对RNA聚合酶和/或σ因子的其他启动子亲和力分类),用于在神经组织中持续表达hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)。在一个实施例中,启动子是用于在神经系统组织(例如但不限于神经元组织和神经胶质组织)中持续的共济蛋白表达的弱启动子。

[0324] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含弗里德赖希共济失调(FRDA)启动子。

[0325] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含遍在蛋白c(UBC)启动子。UBC启动子可具有300-350个核苷酸的大小。作为非限制性实例,UBC启动子是332个核苷酸。

[0326] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含β-葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)启动子。GUSB启动子可具有350-400个核苷酸的大小。作为非限制性实例,GUSB启动子是378个核苷酸。作为非限制性实例,AAV载体质粒可以是5'-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG-3',其中AAV载体质粒可以是自身互补的,并且衣壳可以是DJ血清型。

[0327] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含神经丝(NFL)启动子。NFL启动子可具有600-700个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFL启动子是650个核苷酸。作为非限制性实例,AAV载体质粒可以是5'-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG-3,其中AAV载体质粒可以是自身互补的,并且衣壳可以是DJ血清型。

[0328] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含神经丝重(NFH)启动子。NFH启动子可具有900-950个核苷酸的大小。作为非限制性实例,NFH启动子是920个核苷酸。作为非限制性实例,AAV载体质粒可以是5'-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG-3',其中AAV载体质粒可以是自身互补的,并且衣壳可以是DJ血清型。

[0329] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含SCN8A启动子。SCN8A启动子可具有450-500个核苷酸的大小。作为非限制性实例,SCN8A启动子是470个核苷酸。作为非限制性实例,AAV载体质粒可以是d'-启动子-CMV/珠蛋白内含子-hFXN-RBG-3,其中AAV载体质粒可以是自身互补的,并且衣壳可以是DJ血清型。

[0330] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含共济蛋白(FXN)启动子。

[0331] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含磷酸甘油酸激酶1(PGK)启动子。

[0332] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子。

[0333] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0334] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含H1启动子。

[0335] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含U6启动子。

[0336] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含肝脏或骨骼肌启动子。肝脏启动子的非限制性实例包括hAAT和TBG。骨骼肌启动子的非限制性实例包括Desmin、MCK和C5-12。

[0337] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含工程化的启动子,例如衍生自本文所述启动子但不相同的启动子。

[0338] 增强元件

[0339] 在一个实施例中,AAV载体质粒可包含至少一种增强子和/或表达元件。增强子或表达元件可以与调节序列(例如,启动子)组合使用。在一个实施例中,AAV载体质粒包含转基因增强子、启动子和/或5'UTR内含子。转基因增强子,在本文中也称为"增强子",可以是但不限于CMV增强子(或其片段,例如,如本文所述)。启动子可以是但不限于CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、突触蛋白,MeCP2和GFAP启动子。5'UTR/内含子可以是但不限于SV40和CBA-MVM。

[0340] 在一个实施例中,AAV载体包含内含子,任选地置于启动子元件和编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸之间。不受理论束缚,已显示包含5'内含子可增强编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的mRNA的水平和稳态。在实施例中,增强子是衍生自SV40的5'内含子。在一个实施例中,SV40内含子包含以下序列,例如由以下序列组成:

[0341] gtaagtt tagtcttttt gtcttttatt tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg ctcctcagtg gatgttgcct ttacttctag

[0342] (SEQ ID NO:137)

[0343] 在一个实施例中,AAV载体质粒(例如,AAV载体的AAV载体质粒)包含增强子、启动子和/或内含子组合,例如但不限于(1)CMV增强子、CMV启动子、SV40 5'UTR内含子(例如,如本文所述);(2)CMV增强子、CBA启动子、SV40 5'UTR内含子(例如,如本文所述);(3)CMV增强子、CBA启动子、CBA-MVM 5'UTR内含子(例如,如本文所述)。

[0344] 转基因增强

[0345] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其可以增强转基因靶标特异性和表达(参见例如Powell等人Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy[增强基因治疗中转基因靶特异性和表达的病毒表达盒元件],2015;其内容通过引用整体并入本文中)。用于增强转基因靶特异性和表达的转基因增强子元件的非限制性实例包括启动子、内源miRNA,转录后调节元件(PRE)、聚腺苷酸化(聚A)信号序列和上游增强子(USE)、CMV增强子和内含子。

[0346] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是CMV增强子。在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是启动子。

[0347] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是内含子。

[0348] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是内源miRNA。

[0349] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是转录后调节元件(PRE)。

[0350] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是聚腺苷酸化(聚A)信号序列。在实施例中,AAV载体的AAV载体质粒包含生长激素聚A信号。在一个实施例中,生长激素聚A信号衍生自牛生长激素(BGH)聚A信号。BGH聚A信号序列的一个实例是:ctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttgcccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaataaaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggtggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg ggga

[0351] (SEQ ID NO:138)

[0352] 在实施例中,AAV载体质粒包含编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸下游(例如,3')的聚A信号(例如,BGH聚A信号)。

[0353] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种转基因增强子元件,其是上游增强子(USE)。

[0354] 组织特异性表达

[0355] 在一个实施例中,载体基因组可包含组织特异性表达元件,以促进hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)在组织和/或细胞中的表达。作为非限制性实例,启动子可以是组织特异性表达元件,其包括但不限于人延伸因子1a亚基(EF-1a)、即时-早期巨细胞病毒(CMV)、鸡β-肌动蛋白(CBA)及其衍生物CAG、β葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)和泛素C(UBC)。

[0356] 在一个实施例中,载体基因组可包含可用于将表达限制于某些细胞类型的组织特异性表达元件,例如但不限于可用于将表达限制于神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞的神经系统启动子。

[0357] 在一个实施例中,载体基因组可包含神经元的组织特异性表达元件,例如但不限于神经元特异性烯醇化酶(NSE)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板衍生生长因子B链(PDGF-β)、突触蛋白(Syn)、甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)、Ca<2+>/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)、代谢型谷氨酸受体2(mGluR2)、NFL、NFH、ηβ2、PPE、Enk和EAAT2启动子。

[0358] 在一个实施例中,载体基因组可包含星形胶质细胞的组织特异性表达元件,例如但不限于胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和EAAT2启动子。

[0359] 在一个实施例中,载体基因组可包含少突胶质细胞的组织特异性表达元件,例如但不限于髓磷脂碱性蛋白(MBP)启动子。

[0360] 内含子

[0361] 在一个实施例中,AAV载体质粒包含至少一种增强转基因表达的元件,例如一种或多种内含子或其部分。

[0362] 在一个实施例中,有效负载构建体包含至少一种增强转基因表达的元件,例如一种或多种内含子或其部分。

[0363] 内含子的非限制性实例包括MVM(67bp-97bp)、FIX截短的内含子1(300bp)、β-珠蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bp)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bp)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂合腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bp)。

[0364] 在一个实施例中,内含子或内含子部分的长度可以是100-500个核苷酸。启动子可

以具有80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500的长度。内含子可以具有80-100之间、80-120之间、80-140之间、80-160之间、80-180之间、80-200之间、80-250之间、80-300之间、80-350之间、80-400之间、80-450之间、80-500之间、200-300之间、200-400之间、200-500之间、300-400之间、300-500之间或400-500之间的长度。

[0365] 在一个实施例中,AAV载体包含内含子,任选地置于启动子元件和编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸之间。不受理论束缚,已显示包含5'内含子可增强编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的mRNA的水平和稳态。在实施例中,增强子是衍生自SV40的5'内含子。在一个实施例中,SV40内含子包含以下序列,例如由以下序列组成:

[0366] gtaagtt tagtcttttt gtcttttatt tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg ctcctcagtg gatgttgcct ttacttctag

[0367] (SEQ ID NO:137)

[0368] 在一个实施例中,AAV载体的AAV载体质粒包含(1)CMV增强子(例如,SEQ ID NO:134),(2)CBA启动子(例如,SEQ ID NO:135),(3)SV40内含子(例如,SEQ ID NO:137),(4)编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸,和(5)BGH聚A信号(例如,SEQ ID NO):138)。在一个实施例中,元件(1)至(5)从5'至3'布置在AAV载体质粒上。在实施例中,元件(1)至(5)布置在还包含ITR(例如,5'ITR和3'ITR)的AAV载体质粒上。在实施例中,ITR衍生自AAV2 ITR。

[0369] 在一个实施例中,AAV载体质粒是自身互补的AAV载体质粒。"自身互补"或缩写"sc"指自我互补。"自身互补AAV"或"scAAV"是指其中由重组AAV核酸序列携带的编码区已被设计为形成分子内双链DNA模板的一种构建体。不受理论束缚,在感染时,未等待细胞介导的第二条链合成,而是两条互补的半scAAV将缔合以形成易于立即复制和转录的一条双链DNA(dsDNA)。参见例如D M·麦卡迪(D M McCarty)等人,"自我互补重组腺相关病毒(scAAV)载体独立于DNA合成促进高效转导(Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV)vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis)",基因治疗(Gene Therapy),(2001年8月),第8卷,第16期,第1248-1254页(通过引用整体并入)。自身互补的AAV描述于例如美国专利号6,596,535;7,125,717;以及7,456,683,这些专利各自通过引用整体并入本文中。例如,可以突变5'ITR,例如,通过删除末端拆分位点以允许基因组的发夹形成。

[0370] 衣壳和衣壳血清型

[0371] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可以包衣在衣壳结构中或可以不含衣壳。此类无衣壳病毒载体供体和/或受体序列如AAV描述于例如美国公开2014/0107186中,其内容通过引用整体并入。

[0372] 在一些实施例中,根据本发明产生的AAV颗粒可以包含杂合血清型,其具有对中枢神经系统中感兴趣的特定细胞类型的增强的转导、延长的转基因表达和/或安全性谱。杂合血清型可以通过反式包封、双特异性抗体吸附至衣壳表面、镶嵌衣壳和嵌合衣壳、和/或其他衣壳蛋白修饰来产生。

[0373] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可通过以下针对特定治疗应用进一步进行修饰:衣壳蛋白的合理诱变(参见,例如,Pulicherla等人,Mol Ther[分子治疗],201 1,19:1070-1078),肽配体(例如衍生自NMDA受体激动剂的用于增强逆行转运的肽)掺入衣壳(Xu等人,Virology[病毒学],2005,341:203-214),并定向进化以产生新的AAV变体,例如用于增加CNS转导。

[0374] 在一些实施例中,根据本发明产生的AAV颗粒可包含天然存在的和/或重组的不同衣壳蛋白,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV 8、AAV9、AAV 10、和AAV11、AAV 12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ、和AAV-DJ/8衣壳血清型或其变体(例如,AAV3A和AAV3B)。编码可用于本发明的一种或多种AAV衣壳蛋白的核酸序列披露在国际公开号WO2015191508中,其内容通过引用整体并入本文中。

[0375] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自任何天然或重组AAV血清型。根据本发明,AAV颗粒可以利用或基于选自以下中任何的血清型:AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV 12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAVl-7/rh.48、AAVl-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-l l/rh.53、AAV4-8/r 11.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAVA3.3、AAV A3.4、AAV A3.5、AAV A3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5Rl、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5Rl、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44Rl、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48Rl、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、

AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8RA586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV改组100-1、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV改组100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.1、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真实型AAV(ttAAV)、UPEN AAV 10和/或日本AAV 10血清型、及其变体。

[0376] 作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAV2。作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAVrh10。作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAV9(hu14)。作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAV-DJ。作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAV9.47。作为非限制性实例,重组AAV病毒的衣壳是AAV-DJ8。

[0377] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国公开号US20030138772(其内容通过引用整体并入本文中),例如但不限于AAV1(US20030138772的SEQ ID NO:6和64)、AAV2(US20030138772的SEQ ID NO:7和70)、AAV3(US20030138772的SEQ ID NO:8和71)、AAV4(US 20030138772的SEQ ID NO:63)、AAV5(US20030138772的SEQ ID NO:114)、AAV6(US20030138772的SEQ ID NO:65)、AAV7(US20030138772的SEQ ID NO:1-3)、AAV 8(US20030138772的SEQ ID NO:4和95)、AAV9(US20030138772的SEQ ID NO:5和100)、AAV10(US20030138772的SEQ ID NO:117)、AAV11(US20030138772的SEQ ID NO:118)、AAV 12(US20030138772的SEQ ID NO:119)、AAVrh10(US20030138772的SEQ ID NO:81的氨基酸1至738)、AAV16.3(US20030138772 SEQ ID NO:10)、AAV29.3/bb.1(US 20030138772SEQ ID NO:11)、AAV29.4(US20030138772 SEQ ID NO:12)、AAV29.5/bb.2(US20030138772 SEQ ID NO:13)、AAV1.3(US 20030138772SEQ ID NO:14)、AAV13.3(US20030138772 SEQ ID NO:15)、AAV24.1(US20030138772 SEQ ID NO:16)、AAV27.3(US 20030138772SEQ ID NO:17)、AAV7.2(US20030138772 SEQ ID NO:18)、AAVC1(US20030138772 SEQ ID NO:19)、AAVC3(US 20030138772SEQ ID NO:20)、AAVC5(US20030138772 SEQ ID NO:21)、AAVF1(US20030138772 SEQ ID NO:22)、AAVF3(US

20030138772SEQ ID NO:23)、AAVF5(US20030138772 SEQ ID NO:24)、AAVH6(US20030138772 SEQ ID NO:25)、AAVH2(US 20030138772SEQ ID NO:26)、AAV42-8(US20030138772 SEQ ID NO:27)、AAV42-15(US20030138772 SEQ ID NO:28)、AAV42-5b(US20030138772SEQ ID NO:29)、AAV42-1b(US20030138772 SEQ ID NO:30)、AAV42-13(US20030138772 SEQ ID NO:31)、AAV42-3a(US 20030138772SEQ ID NO:32)、AAV42-4(US20030138772 SEQ ID NO:33)、AAV42-5a(US20030138772 SEQ ID NO:34)、AAV42-10(US20030138772SEQ ID NO:35)、AAV42-3b(US20030138772 SEQ ID NO:36)、AAV42-11(US20030138772 SEQ ID NO:37)、AAV42-6b(US 20030138772SEQ ID NO:38)、AAV43-1(US20030138772 SEQ ID NO:39)、AAV43-5(US20030138772 SEQ ID NO:40)、AAV43-12(US20030138772SEQ ID NO:41)、AAV43-20(US20030138772 SEQ ID NO:42)、AAV43-21(US20030138772 SEQ ID NO:43)、AAV43-23(US 20030138772SEQ ID NO:44)、AAV43-25(US20030138772 SEQ ID NO:45)、AAV44.1(US20030138772 SEQ ID NO:46)、AAV44.5(US20030138772SEQ ID NO:47)、AAV223.1(US20030138772 SEQ ID NO:48)、AAV223.2(US20030138772 SEQ ID NO:49)、AAV223.4(US 20030138772SEQ ID NO:50)、AAV223.5(US20030138772 SEQ ID NO:51)、AAV223.6(US20030138772 SEQ ID NO:52)、AAV223.7(US20030138772SEQ ID NO:53)、AAV A3.4(US20030138772 SEQ ID NO:54)、AAV A3.5(US20030138772 SEQ ID NO:55)、AAV A3.7(US 20030138772SEQ ID NO:56)、AAV A3.3(US20030138772 SEQ ID NO:57)、AAV42.12(US20030138772 SEQ ID NO:58)、AAV44.2(US20030138772SEQ ID NO:59)、AAV42-2(US20030138772 SEQ ID NO:9)、或其变体。

[0378] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国公开号US20150159173(内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如,但不限于,AAV2(US 20150159173的SEQ ID NO:7和23)、rh20(US20150159173的SEQ ID NO:1)、rh32/33(US20150159173的SEQ ID NO:2)、rh39(US 20150159173的SEQ ID NO:3、20和36)、rh46(US20150159173的SEQ ID NO:4和22)、rh73(US20150159173的SEQ ID NO:5)、rh74(US20150159173的SEQ ID NO:6)、AAV6.1(US20150159173的SEQ ID NO:29)、rh.8(US20150159173的SEQ ID NO:41)、rh.48.1(US20150159173的SEQ ID NO:44)、hu.44(US20150159173的SEQ ID NO:45)、hu.29(US20150159173的SEQ ID NO:42)、hu.48(US20150159173的SEQ ID NO:38)、rh54(US20150159173的SEQ ID NO:49)、AAV2(US20150159173的SEQ ID NO:7)、cy.5(US20150159173的SEQ ID NO:8和24)、rh.10(US20150159173的SEQ ID NO:9和25)、rh.13(US20150159173的SEQ ID NO:10和26)、AAV1(US20150159173的SEQ ID NO:11和27)、AAV3(US20150159173的SEQ ID NO:12和28)、AAV6(US20150159173的SEQ ID NO:13和29)、AAV7(US 20150159173的SEQ ID NO:14和30)、AAV8(US20150159173的SEQ ID NO:15和31)、hu.13(US20150159173的SEQ ID NO:16和32)、hu.26(US20150159173的SEQ ID NO:17和33)、hu.37(US20150159173的SEQ ID NO:18和34)、hu.53(US20150159173的SEQ ID NO:19和35)、rh.43(US20150159173的SEQ ID NO:21和37)、rh2(US 20150159173的SEQ ID NO:39)、rh.37(US20150159173的SEQ ID NO:40)、rh.64(US20150159173的SEQ ID NO:43)、rh.48(US20150159173的SEQ ID NO:44)、ch.5(US20150159173的SEQ ID NO 46)、rh.67(US20150159173的SEQ ID NO:47)、rh.58(US20150159173的SEQ ID NO:48)、或其变体,包括但不限于Cy5R1、Cy5R2、Cy5R3、Cy5R4、

rh.13R、rh.37R2、rh.2R、rh.8R、rh.48.1、rh.48.2、rh.48.1.2、hu.44R1、hu.44R2、hu.44R3、hu.29R、ch.5R1、rh64R1、rh64R2、AAV6.2、AAV6.1、AAV6.12、hu.48R1、hu.48R2、和hu.48R3。

[0379] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 7198951(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAV9(US 7198951的SEQ ID NO:1-3)、AAV2(US 7198951的SEQ ID NO:4)、AAV1(US 7198951的SEQ ID NO:5)、AAV3(US 7198951的SEQ ID NO:6)和AAV 8(US7198951的SEQ ID NO:7)。

[0380] 在一些实施例中,AAV载体包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有N Pulicherla等人(Molecular Therapy[分子治疗]19(6):1070-1078(2011),其内容通过引用整体并入本文中)中所述的AAV9序列中的突变,例如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。在一些实施例中,AAV衣壳包含一个或多个经工程改造以将载体递送穿过血脑屏障的序列(参见例如B.E.Deverman等人,Nature Biotech[自然生物技术],第34卷,第2期,第204-211页(2016年2月1日在线发表)和加州理工学院新闻稿,A.Wetherston,www.neurology-cenfrd.com/2016/02/10/successfd/brain-barrier;还参见WO 2016/0492301和US 8,734,809(这些中的每一个的内容通过引用整体并入)。

[0381] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 6156303(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAV3B(US 6156303的SEQ ID NO:1和10)、AAV6(US 6156303的SEQ ID NO:2、7和11),AAV2(US 6156303的SEQ ID No:3和8)、AAV3A(US 6156303的SEQ ID NO:4和9),或其衍生物。

[0382] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国公开号US20140359799(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAV 8(US20140359799的SEQ ID NO:1)、AAVDJ(US20140359799的SEQ ID NO:2和3)、或其变体。

[0383] 在一些实施例中,AAV颗粒可包含来自血清型的衣壳,例如但不限于AAVDJ或其变体,例如AAVDJ8(或AAV-DJ8),如Grimm等人(Journal of Virology[病毒学杂志]82(12):5887-5911(2008),通过引用整体并入本文中)所述。AAVDJ8的氨基酸序列可包含两个或更多个突变以除去肝素结合结构域(HBD)。作为非限制性实例,在美国专利号7,588,772(其内容通过引用整体并入本文中)中描述为SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可包含两个突变:(1)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln)和(2)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实例,可包含三个突变:(1)K406R,其中氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)改变为精氨酸(R;Arg),(2)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln)和(3)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。

[0384] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如国际公开号WO 1998011244(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的AAV4的序列,例如但不限于AAV4(WO 1998011244的SEQ ID NO:1-20)。

[0385] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可以包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可

以是或可以具有AAV2序列中的突变以产生如国际公开号WO 2014144229(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的AAV2G9。

[0386] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有国际公开号WO 2005033321(其内容通过引用整体并入本文中)中描述的序列,例如,但不限于AAV3-3(WO 2005033321的SEQ ID NO:217)、AAV1(WO 2005033321的SEQ ID NO:219和202)、AAV106.1/hu.37(WO 2005033321的SEQ ID NO:10)、AAV114.3/hu.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:11)、AAV127.2/hu.41(WO 2005033321的SEQ ID NO:6和8)、AAV128.3/hu.44(WO 2005033321的SEQ ID NO:81)、AAV130.4/hu.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:78)、AAV145.1/hu.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:176和177)、AAV145.6/hu.56(WO 2005033321的SEQ ID NO:168和192)、AAV16.12/hu.11(WO 2005033321的SEQ ID NO:153和57)、AAV16.8/hu.10(WO 2005033321的SEQ ID NO:156和56)、AAV161.10/hu.60(WO 2005033321的SEQ ID NO:170)、AAV161.6/hu.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:174)、AAV1-7/rh.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:32)、AAV1-8/rh.49(WO 2005033321的SEQ ID NO:103和25)、AAV2(WO 2005033321的SEQ ID NO:211和221)、AAV2-15/rh.62(WO 2005033321的SEQ ID NO:33和114)、AAV2-3/rh.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:21)、AAV2-4/rh.50(WO 2005033321的SEQ ID NO:23和108)、AAV2-5/rh.51(WO 2005033321的SEQ ID NO:104和22)、AAV3.1/hu.6(WO 2005033321的SEQ ID NO:5和84)、AAV3.1/hu.9(WO 2005033321的SEQ ID NO:155和58)、AAV3-1 1/rh.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:186和176)、AAV3-3(WO 2005033321的SEQ ID NO:200)、AAV33.12/hu.17(WO 2005033321的SEQ ID NO:4)、AAV33.4/hu.15(WO 2005033321的SEQ ID NO:50)、AAV33.8/hu.16(WO 2005033321的SEQ ID NO:51)、AAV3-9/rh.52(WO 2005033321的SEQ ID NO:96和18)、AAV4-19/rh.55(WO 2005033321的SEQ ID NO:117)、AAV4-4(WO 2005033321的SEQ ID NO:201和218)、AAV4-9/rh.54(WO 2005033321的SEQ ID NO:116)、AAV5(WO 2005033321的SEQ ID NO:199和216)、AAV52.1/hu.20(WO 2005033321的SEQ ID NO:63)、AAV52/hu.19(WO 2005033321的SEQ ID NO:133)、AAV5-22/rh.58(WO 2005033321的SEQ ID NO:27)、AAV5-3/rh.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:105)、AAV5-3/rh.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:26)、AAV58.2/hu.25(WO 2005033321的SEQ ID NO:49)、AAV6(WO 2005033321的SEQ ID NO:203和220)、AAV7(WO 2005033321的SEQ ID NO:222和213)、AAV7.3/hu.7(WO 2005033321的SEQ ID NO:55)、AAV8(WO 2005033321的SEQ ID NO:223和214)、AAVH-1/hu.1(WO 2005033321的SEQ ID NO:46)、AAVH-5/hu.3(WO 2005033321的SEQ ID NO:44)、AAVhu.1(WO 2005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.10(WO 2005033321的SEQ ID NO:156)、AAVhu.11(WO 2005033321的SEQ ID NO:153)、AAVhu.12(WO 2005033321 SEQ ID NO:59)、AAVhu.13(WO 2005033321的SEQ ID NO:129)、AAVhu.14/AAV9(WO 2005033321的SEQ ID NO:123和3)、AAVhu.15(WO 2005033321的SEQ ID NO:147)、AAVhu.16(WO 2005033321的SEQ ID NO:148)、AAVhu.17(WO 2005033321的SEQ ID NO:83)、AAVhu.18(WO 2005033321的SEQ ID NO:149)、AAVhu.19(WO 2005033321的SEQ ID NO:133)、AAVhu.2(WO 2005033321的SEQ ID NO:143)、AAVhu.20(WO 2005033321的SEQ ID NO:134)、AAVhu.21(WO 2005033321的SEQ ID NO:135)、AAVhu.22(WO 2005033321的SEQ ID NO:138)、AAVhu.23.2(WO 2005033321的SEQ ID NO:137)、AAVhu.24(WO 2005033321的SEQ ID NO:136)、AAVhu.25(WO 2005033321的SEQ ID NO:146)、

AAVhu.27(WO 2005033321的SEQ ID NO:140)、AAVhu.29(WO 2005033321的SEQ ID NO:132)、AAVhu.3(WO 2005033321的SEQ ID NO:145)、AAVhu.31(WO 2005033321的SEQ ID NO:121)、AAVhu.32(WO 2005033321的SEQ ID NO:122)、AAVhu.34(WO 2005033321的SEQ ID NO:125)、AAVhu.35(WO 2005033321的SEQ ID NO:164)、AAVhu.37(WO 2005033321的SEQ ID NO:88)、AAVhu.39(WO 2005033321的SEQ ID NO:102)、AAVhu.4(WO 2005033321的SEQ ID NO:141)、AAVhu.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:87)、AAVhu.41(WO 2005033321的SEQ ID NO:91)、AAVhu.42(WO 2005033321的SEQ ID NO:85)、AAVhu.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:160)、AAVhu.44(WO 2005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.45(WO 2005033321的SEQ ID NO:127)、AAVhu.46(WO 2005033321的SEQ ID NO:159)、AAVhu.47(WO 2005033321的SEQ ID NO:128)、AAVhu.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:157)、AAVhu.49(WO 2005033321的SEQ ID NO:189)、AAVhu.51(WO 2005033321的SEQ ID NO:190)、AAVhu.52(WO 2005033321的SEQ ID NO:191)、AAVhu.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:186)、AAVhu.54(WO 2005033321的SEQ ID NO:188)、AAVhu.55(WO 2005033321的SEQ ID NO:187)、AAVhu.56(WO 2005033321的SEQ ID NO:192)、AAVhu.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:193)、AAVhu.58(WO 2005033321的SEQ ID NO:194)、AAVhu.6(WO 2005033321的SEQ ID NO:84)、AAVhu.60(WO 2005033321的SEQ ID NO:184)、AAVhu.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:185)、AAVhu.63(WO 2005033321的SEQ ID NO:195)、AAVhu.64(WO 2005033321的SEQ ID NO:196)、AAVhu.66(WO 2005033321的SEQ ID NO:197)、AAVhu.67(WO 2005033321的SEQ ID NO:198)、AAVhu.7(WO 2005033321的SEQ ID NO:150)、AAVhu.8(WO 2005033321 SEQ ID NO:12)、AAVhu.9(WO 2005033321的SEQ ID NO:155)、AAVLG-10/rh.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:14)、AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321的SEQ ID NO:86)、AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321的SEQ ID NO:7)、AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:163)、AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:43)、AAVpi.1(WO 2005033321 SEQ ID NO:28)、AAVpi.2(WO 2005033321 SEQ ID NO:30)、AAVpi.3(WO 2005033321 SEQ ID NO:29)、AAVrh.38(WO 2005033321的SEQ ID NO:86)、AAVrh.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:92)、AAVrh.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:163)、AAVrh.44(WO 2005033321 SEQ ID NO:34)、AAVrh.45(WO 2005033321 SEQ ID NO:41)、AAVrh.47(WO 2005033321 SEQ ID NO:38)、AAVrh.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:115)、AAVrh.49(WO 2005033321的SEQ ID NO:103)、AAVrh.50(WO 2005033321的SEQ ID NO:108)、AAVrh.51(WO 2005033321的SEQ ID NO:104)、AAVrh.52(WO 2005033321的SEQ ID NO:96)、AAVrh.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:97)、AAVrh.55(WO 2005033321 SEQ ID NO:37)、AAVrh.56(WO 2005033321的SEQ ID NO:152)、AAVrh.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:105)、AAVrh.58(WO 2005033321的SEQ ID NO:106)、AAVrh.59(WO2005033321SEQ ID NO:42)、AAVrh.60(WO 2005033321 SEQ ID NO:31)、AAVrh.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:107)、AAVrh.62(WO 2005033321的SEQ ID NO:114)、AAVrh.64(WO 2005033321的SEQ ID NO:99)、AAVrh.65(WO 2005033321 SEQ ID NO:35)、AAVrh.68(WO 2005033321SEQ ID NO:16)、AAVrh.69(WO 2005033321 SEQ ID NO:39)、AAVrh.70(WO 2005033321 SEQ ID NO:20)、AAVrh.72(WO 2005033321SEQ ID NO:9),或其变体,包括但不限于AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVcy.6、AAVrh.12、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.25/42 15、AAVrh.31、AAVrh.32、

AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh14。变体的非限制性实例WO 2005033321(其内容通过引用整体并入本文中)的SEQ ID NO:13、15、17、19、24、36、40、45、47、48、51-54、60-62、64-77、79、80、82、89、90、93-95、98、100、101、109-113、118-120、124、126、131、139、142、151,154、158、161、162、165-183、202、204-212、215、219、224-236。

[0387] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如国际公开号WO 2015168666(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAVrh8R(WO 2015168666的SEQ ID NO:9)、AAVrh8R A586R突变体(WO 2015168666的SEQ ID NO:10)、AAVrh8R R533A突变体(WO 2015168666的SEQ ID NO:11)、或其变体。

[0388] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如国际公开号WO2018/160582(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAVhu68(WO 2018160582的SEQ ID NO:2),或其变体。

[0389] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有美国专利号US 9233131(其内容通过引用整体并入本文中)中描述的序列,例如,但不限于AAVhE1.1(US9233131的SEQ ID NO:44)、AAVhEr1.5(US 9233131的SEQ ID NO:45)、AAVhER1.14(US 9233131的SEQ ID NO:46)、AAVhEr1.8(US 9233131的SEQ ID NO:47)、AAVhEr1.16(US 9233131的SEQ ID NO:48)、AAVhEr1.18(US 9233131的SEQ ID NO:49)、AAVhEr1.35(US 9233131的SEQ ID NO:50)、AAVhEr1.7(US 9233131的SEQ ID NO:51)、AAVhEr1.36(US 9233131的SEQ ID NO:52)、AAVhEr2.29(US 9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr2.4(US 9233131的SEQ ID NO:54)、AAVhEr2.16(US 9233131的SEQ ID NO:55)、AAVhEr2.30(US 9233131的SEQ ID NO:56)、AAVhEr2.31(US 9233131的SEQ ID NO:58)、AAVhEr2.36(US 9233131的SEQ ID NO:57)、AAVhER1.23(US 9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr3.1(US 9233131的SEQ ID NO:59)、AAV2.5T(US 9233131的SEQ ID NO:42)、或其变体。

[0390] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有美国专利公开号US20150376607(其内容通过引用整体并入本文中)中描述的序列,例如,但不限于AAV-PAEC(US20150376607的SEQ ID NO:1)、AAV-LK01(US20150376607的SEQ ID NO:2)、AAV-LK02(US20150376607的SEQ ID NO:3)、AAV-LK03(US20150376607的SEQ ID NO:4)、AAV-LK04(US20150376607的SEQ ID NO:5)、AAV-LK05(US20150376607的SEQ ID NO:6)、AAV-LK06(US20150376607的SEQ ID NO:7)、AAV-LK07(US20150376607的SEQ ID NO:8)、AAV-LK08(US 20150376607的SEQ ID NO:9)、AAV-LK09(US20150376607的SEQ ID NO:10)、AAV-LK10(US20150376607的SEQ ID NO:1)、AAV-LK11(US20150376607的SEQ ID NO:12)、AAV-LK12(US20150376607的SEQ ID NO:13)、AAV-LK13(US20150376607的SEQ ID NO:14)、AAV-LK14(US20150376607的SEQ ID NO:15)、AAV-LK15(US 20150376607的SEQ ID NO:16)、AAV-LK16(US20150376607的SEQ ID NO:17)、AAV-LK17(US20150376607的SEQ ID NO:18)、AAV-LK18(US20150376607的SEQ ID NO:19)、AAV-LK19(US 20150376607的SEQ ID NO:20)、AAV-PAEC2(US20150376607的SEQ ID NO:21)、AAV-PAEC 4(US20150376607的SEQ ID NO:22)、AAV-PAEC6(US20150376607的SEQ ID NO:23)、AAV-PAEC7(US 20150376607的SEQ ID NO:24)、AAV-PAEC 8(US20150376607的SEQ ID NO:

25)、AAV-PAEC11(US20150376607的SEQ ID NO:26)、AAV-PAEC 12(US20150376607的SEQ ID No:27)、或其变体。

[0391] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 9163261(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAV-2-pre-miRNA-101(US 9163261的SEQ ID NO:1),或其变体。

[0392] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国专利公开号US20150376240(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAV-8h(US20150376240的SEQ ID NO:6)、AAV-8b(US20150376240的SEQ ID NO:5)、AAV-h(US20150376240的SEQ ID NO:2)、AAV-b(US20150376240的SEQ ID NO:1)、或其变体。

[0393] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有美国专利公开号US20160017295(其内容通过引用整体并入本文中)中描述的序列,例如,但不限于AAV SM 10-2(US20160017295的SEQ ID NO:22)、AAV改组100-1(US20160017295的SEQ ID NO:23)、AAV改组100-3(US20160017295的SEQ ID NO:24)、AAV改组100-7(US20160017295的SEQ ID NO:25)、AAV改组10-2(US20160017295的SEQ ID NO:34)、AAV改组10-6(US20160017295的SEQ ID NO:35)、AAV改组10-8(US 20160017295的SEQ ID NO:36)、AAV改组100-2(US20160017295的SEQ ID NO:37)、AAV SM 10-1(US20160017295的SEQ ID NO:38)、AAV SM 10-8(US20160017295的SEQ ID NO:39)、AAV SM 100-3(US20160017295的SEQ ID NO:40)、AAV SM 100-10(US 20160017295的SEQ ID NO:41)、或其变体。

[0394] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如美国专利公开号US20150238550(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于BNP61 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:1)、BNP62 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:3)、BNP63 AAV(US20150238550的SEQ ID NO:4)、或其变体。

[0395] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有美国专利公开号US20150315612(其内容通过引用整体并入本文中)中描述的序列,例如,但不限于AAVrh.50(US20150315612的SEQ ID NO:108)、AAVrh.43(US20150315612的SEQ ID NO:163)、AAVrh.62(US20150315612的SEQ ID NO:114)、AAVrh.48(US20150315612的SEQ ID NO:115)、AAVhu.19(US 20150315612的SEQ ID NO:133)、AAVhu.l l(US20150315612的SEQ ID NO:153)、AAVhu.53(US20150315612的SEQ ID NO:186)、AAV4-8/rh.64(US20150315612的SEQ ID NO:15)、AAVLG-9/hu.39(US20150315612的SEQ ID NO:24)、AAV54.5/hu.23(US20150315612的SEQ ID NO:60)、AAV54.2/hu.22(US20150315612的SEQ ID NO:67)、AAV54.7/hu.24(US20150315612的SEQ ID NO:66)、AAV54.1/hu.21(US20150315612的SEQ ID NO:65)、AAV54.4R/hu.27(US20150315612的SEQ ID NO:64)、AAV46.2/hu.28(US20150315612的SEQ ID NO:68)、AAV46.6/hu.29(US20150315612的SEQ ID NO:69)、AAV128.1/hu.43(US20150315612的SEQ ID NO:80)、或其变体。

[0396] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含或衍生自AAV血清型,该AAV血清型可以是或可以具有如国际公开号WO 2015121501(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序

列,例如但不限于真实型AAV(ttAAV)(WO 2015121501的SEQ ID NO:2)、"UPenn AAV10"(WO 2015121501的SEQ ID NO:8)、"日本AAV10"(WO 2015121501的SEQ ID NO:9)、或其变体。

[0397] 根据本发明,AAV颗粒可包含可选自或衍生自多种物种的AAV衣壳血清型。在一个实施例中,AAV可以是禽类AAV(AAAV)。AAAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 9238800(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于AAAV(US 9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12、和14),或其变体。

[0398] 在一个实施例中,AAV颗粒可包含AAV衣壳血清型,其可以是或来源于牛AAV(BAAV)。BAAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 9,193,769(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于BAAV(US 9193769的SEQ ID NO:1和6),或其变体。BAAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 7427396(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于BAAV(US 7427396的SEQ ID NO:5和6),或其变体。

[0399] 在一个实施例中,AAV颗粒可包含AAV衣壳血清型,其可以是或来源于山羊AAV。山羊AAV血清型可以是或可以具有如美国专利号US 7427396(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列,例如但不限于山羊AAV(US 7427396的SEQ ID NO:3),或其变体。

[0400] 在其他实施例中,AAV颗粒可以包含AAV衣壳血清型,其可以被工程化为来自两种或更多种亲本血清型的杂合AAV。在一个实施例中,AAV可以是AAV2G9,其包含来自AAV2和AAV9的序列。AAV2G9AAV血清型可以是或可以具有如美国专利公开号US20160017005(其内容通过引用整体并入本文中)中所述的序列。

[0401] 在一个实施例中,AAV颗粒可包含可由AAV9衣壳文库产生的AAV衣壳血清型,其具有如Pulicherla等人(Molecular Therapy[分子疗法]19(6):1070-1078(2011),其内容通过引用整体并入本文中)所述在氨基酸390-627(VP1编号)中的突变。血清型和相应的核苷酸和氨基酸取代可以是,但不限于AAV9.1(G1594C;D532H)、AAV6.2(T1418A和T1436X;V473D和I479K)、AAV9.3(T1238A;F413Y)、AAV9.4(T1250C和A1617T;F417S)、AAV9.5(A1235G、A1314T、A1642G、C1760T;Q412R、T548A、A587V)、AAV9.6(T1231A;F411I)、AAV9.9(G1203A、G1785T;W595C)、AAV9.10(A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11(A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13(A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14(T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16(A1775T;Q592L)、AAV9.24(T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26(A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33(A1667C;D556A)、AAV9.34(A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35(A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40(A1694T、E565V)、AAV9.41(A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44(A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45(A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46(G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47(G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48(C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50(A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53(G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54(C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55(T1605A;F535L)、AAV9.58(C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59(T1336C;Y446H)、AAV9.61(A1493T;N498I)、AAV9.64(C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65(C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68(C1510A;P504T)、AAV9.80(G1441A,;G481R)、AAV9.83(C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87(T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90(A1196T;Y399F)、AAV9.91(T1316G、A1583T、

C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93(A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94(A1675T;M559L)和AAV9.95(T1605A;F535L)。

[0402] 在一个实施例中,本发明的AAV颗粒可包含具有国际公开号WO 2014160092(其内容通过引用整体并入本文中)的SEQ ID NO:1和3的序列(其具有增加的向脑的趋向性)的衣壳蛋白。

[0403] 在一个实施例中,本发明的AAV颗粒可包含衣壳蛋白,其可靶向中枢神经系统中的少突胶质细胞。衣壳蛋白可包含国际公开号WO 2014052789(其内容通过引用整体并入本文中)的SEQ ID NO:1的AAV衣壳编码序列或含有SEQ ID NO:2至4的氨基酸序列的AAV衣壳蛋白。

[0404] 在一个实施例中,本发明的AAV颗粒可以包含衣壳蛋白,所述衣壳蛋白具有增加的穿过CNS中的血脑屏障的能力,如美国专利号8,927,514(其内容通过引用整体并入本文中)中所公开的。这种衣壳蛋白的氨基酸序列和核酸序列可以分别包括但不限于美国专利号8,927,514的SEQ ID NO:2-17和SEQ ID NO:25-33。

[0405] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAV2衣壳蛋白或其变体。已显示具有AAV2衣壳蛋白的AAV颗粒在脑、视网膜和脊髓中有效地将基因递送至神经元。在一个实施例中,可以进一步修饰AAV2衣壳蛋白,例如将靶向肽添加至将AAV颗粒靶向至脑血管内皮的衣壳蛋白(如美国专利号6,691,948和8,299,215中所披露,其每一个的内容通过引用整体并入本文中)。此类AAV颗粒可用于递送功能性hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)。

[0406] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAV5衣壳蛋白或其变体。具有AAV5衣壳蛋白的AAV颗粒可以转导CNS的各个区域中的神经元,包括皮质、海马(HPC)、小脑、黑质(SN)、纹状体、苍白球和脊髓(Burger C等人,Mol Ther.[分子治疗],2004,10(2):302-317;Liu G等人,Mol Ther.[分子治疗]2007,15(2):242-247;和Colle M等人,Hum,Mol.Genet.[人类分子遗传学额]2010,19(1):147-158)。在一个实施例中,具有AAV 5衣壳蛋白(其具有增加的对CNS中的细胞的转导)的AAV颗粒可以是来自美国专利号7,056,502(其内容通过引用整体并入本文中)的那些颗粒。

[0407] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAV6衣壳蛋白或其变体。重组AAV6血清型可通过脑室内注射(ICV)靶向脊髓中的运动神经元(Dirren E等人,Hum Gene Ther.[人基因治疗],2014,25(2):109-120)。此外,San Sebastian等人的研究表明,AAV6血清型可以在大鼠脑中从末端逆行运输到神经元细胞体(San Sebastian等人,Gen Ther.[基因治疗],2014,20(12):1178-1183)。

[0408] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAV8衣壳蛋白或其变体。具有AAV8衣壳蛋白的AAV颗粒可以转导神经元,例如海马中的神经元(Klein RL等人,Mol Ther.[分子治疗],2006,13(3):517-527)。在一个实施例中,AAV8衣壳蛋白可包含美国专利号8,318,480(其内容通过引用整体并入本文中)的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0409] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAV9衣壳蛋白或其变体。已经在脑内观察到AAV9衣壳血清型介导的基因递送,其在实质内注射至CNS后有效且长期表达转基因(Klein RL等人,Eur JNeurosci.[欧洲神经科学杂志],2008,27:1615-1625)。在新生儿受

试者中进行外周、全身(例如静脉内)给药后,AAV9血清型可在整个CNS中产生稳健且广泛的神经元转导(Foust KD等人,Nat.Biotechnol[自然生物技术],2009,27:59-65;和Duque S等人,Mol Ther.[分子治疗],2009,17:1187-1196)。鞘内(小脑延髓池内途径)施用AAV9血清型也可产生广泛的脊柱表达。在一个实施例中,AAV9血清型可以包含AAV衣壳蛋白,所述AAV衣壳蛋白具有美国专利号7,198,951(其内容通过引用整体并入本文中)的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。另一方面,AAV9血清型可包含SEQ ID NO:2、4或6的VP1衣壳蛋白,其中氨基酸序列中的表面暴露的酪氨酸残基中的至少一个被另一个氨基酸残基取代,如美国专利公开号US20130224836中所公开的,其内容通过引用整体并入本文中。在实施例中,包含AAV9衣壳的AAV载体全身施用,例如静脉内施用。在实施例中,将包含AAV9衣壳的AAV载体施用至脑、脊柱或脑脊液(CSF),例如鞘内施用。

[0410] 在一些实施例中,AAV载体包含经工程化以获得特定特性的变体衣壳蛋白。用于获得工程化的衣壳的这些方法描述于例如专利公开WO 2011038187中,其内容通过引用整体并入本文中。此类方法和载体也描述于例如专利公开WO 2012112832和专利申请公开WO 2015054653中,其内容通过引用整体并入本文中。此类变体衣壳包括例如WO 2015054653的SEQ ID NO:23,或其变体。另外的变体衣壳包括,例如,专利公开WO2017/019994(其内容通过引用整体并入)中描述的那些衣壳序列。在实施例中,AAV载体包含具有Anc80 AAV衣壳序列(例如,WO 2017019994的SEQ ID NO:1)、例如Anc80L65(例如,WO 2017019994的SEQ ID NO:23)、或例如Anc110(例如,WO 2017019994的SEQ ID NO:42)的衣壳。

[0411] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可包含AAVrh10衣壳蛋白或其变体。包含AAVrh10衣壳蛋白的AAV颗粒可在鞘内(IT)施用后靶向脊髓中的神经元以及其他细胞。在一个实施例中,AAVrh10衣壳蛋白可包含欧洲专利号2341068的SEQ ID NO:81的氨基酸序列。[00188]在一些实施例中,本发明的AAV可包含AAVDJ衣壳蛋白、AAVDJ/8衣壳蛋白或其变体。Holehonnur等人表明,AAVDJ/8血清型可以靶向基底和外侧杏仁核(BLA)内的神经元(Holehonnur R等人,BMC Neurosci[BMC神经科学],2014年,2月18日:15:28)。在一个实施例中,AAVDJ衣壳蛋白和/或AAVDJ/8衣壳蛋白可包含氨基酸序列,该氨基酸序列包含衍生自第一AAV血清型(例如,AAV2)的第一区域,衍生自第二AAV血清型(例如,AAV8)的第二区域和衍生自第三AAV血清型(例如,AAV 9)的第三区域,其中该第一、第二和第三区域可包括本说明书中披露的任何氨基酸序列。

[0412] 在一个实施例中,本发明的AAV颗粒可包含已显示或已知转导背根神经节(DRG)的衣壳蛋白。

[0413] 在一个实施例中,本发明的AAV颗粒可包含已显示或已知转导运动神经元的衣壳蛋白。

[0414] 在一个实施例中,AAV颗粒包含自身互补(SC)载体基因组。

[0415] 在一个实施例中,AAV颗粒包含单链(SS)基因组。

[0416] 在一个实施例中,包含自身互补(sc)载体的AAV颗粒可用于产生比包含相应单链载体基因组的AAV颗粒更高的表达。

[0417] 在一个实施例中,本文所述的AAV颗粒的血清型可取决于所需的分布、转导效率和所需的细胞靶向。如Sorrentino等人(comprehensive map of CNS transduction by eight adeno-associated virus serotypes upon cerebrospinal fluid

administration in pigs[猪脑脊液给药后八种腺相关病毒血清型对中枢神经系统转导的综合图谱],Molecular Therapy[分子治疗]接收的文章2015年12月7日在线预览;doi:10.1038/mt.2015.212;其内容通过引用整体并入本文中)所述,AAV血清型提供不同的分布、转导效率和细胞靶向。为了提供所需的功效,需要选择AAV血清型,其不仅最佳匹配待靶向的细胞,而且还匹配所需的转导效率和分布。

[0418] 在一个实施例中,AAV载体包含AAV9衣壳(如本文所述)和AAV载体质粒,该AAV载体质粒包含(1)衍生自AAV2的ITR,(2)CMV增强子(例如,SEQ ID NO:134),(3)CBA启动子(例如,SEQ ID NO:135),(4)SV40内含子(例如,SEQ ID NO:137),(5)编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸,和(6)BGH聚A信号(例如,SEQ ID NO):138)。在一个实施例中,元件(2)至(6)从5'至3'布置在AAV载体质粒上。在实施例中,元件(2)至(6)布置在AAV载体质粒上的5'ITR和3'ITR之间。在一个实施例中,AAV载体是scAAV载体。

[0419] 单克隆抗体的产生

[0420] 单克隆抗体(mAb)可通过多种技术产生,包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein,1975Nature[自然]256:495的标准体细胞杂交技术。可以使用许多用于产生单克隆抗体的技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化。

[0421] 用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生是建立良好的程序。免疫方案和分离免疫脾细胞用于融合的技术是本领域已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0422] 在一些实施例中,本发明的这些抗体是人源化的单克隆抗体。可以基于如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备本发明的嵌合或人源化抗体及其抗原结合片段。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从感兴趣的鼠杂交瘤中获得,并使用标准分子生物学技术工程化以含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(参见例如Cabilly等人的美国专利号4,816,567)。为产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠科动物CDR区域插入人框架中。参见例如,美国专利号5,225,539(属于Winter)和美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6180370(属于Queen等人)。

[0423] 在一些实施例中,本发明的这些抗体是人单克隆抗体。可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来生成这种针对TREM2的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为"人Ig小鼠"。

[0424] HuMAb Mouse® (Medarex,Inc.)含有编码未重排的人重链(μ和γ)和κ轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因miniloci,以及使内源性μ和κ链基因座失活的靶向突变(参见例如,Lonberg,等人,1994Nature[自然]368(6474):856-859)。因此,小鼠表现出小鼠IgM或K的表达降低,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgG-κ单克隆(Lonberg,N.等人,1994同上;在Lonberg,N.,1994Handbook of Experimental Pharmacology[实验药理学手册]113:49-101中的综述;Lonberg,N.和Huszar,D.,1995Intern.Rev.Immunol.[国际免疫学评述]13:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N.,1995Ann.N.Y.Acad.Sci.[纽约科学学术年报]764:536-546)。HuMAb小鼠的制备和用途以及由这样的小鼠进行的基因组修饰被进一步描述于以下文献

中:Taylor,L.等人,1992Nucleic Acids Research[核酸研究]20:6287-6295;Chen,J.等人,1993International Immunology[国际免疫学]5:647-656;Tuaillon等人,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]94:3720-3724;Choi等人,1993Nature Genetics[自然遗传学]4:117-123;Chen,J.等人,1993EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12:821-830;Tuaillon等人,1994J.Immunol.[免疫学杂志]152:2912-2920;Taylor,L.等人,1994International Immunology[国际免疫学]579-591;以及Fishwild,D.等人,1996Nature Biotechnology[自然生物技术]14:845-851,将所有这些文献的内容通过引用以其整体特别特此并入。另外参见美国专利号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;和5,770,429;全部属于Lonberg和Kay;美国专利号5,545,807(属于Surani等人);PCT公开号WO 92103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97113852、WO 98/24884和WO 99/45962(均属于Lonberg和Kay);以及PCT公开号WO 01/14424(属于Korman等人)。

[0425] 在一些实施例中,人抗体可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠中产生。此类小鼠(在本文中被称为“KM小鼠”)在PCT公开WO 02/43478(属于Ishida等人)中有详细描述。

[0426] 仍此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统是本领域可获得的,并且可用于产生TREM2结合抗体及其抗原结合片段。例如,可以使用被称为Xenomouse(安根尼克斯公司(Abgenix,Inc.))的可替代的转基因系统。这样的小鼠描述于例如,美国专利号5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963(属于Kucherlapati等人)。

[0427] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统是本领域可获得的,并且可用于产生本发明的TREM2结合抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的称为“TC小鼠”的小鼠;这样的小鼠描述于Tomizuka等人,2000Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]97:722-727中。此外,本领域已经描述了携带人重链和轻链转染色体的牛(Kuroiwa等人,2002Nature Biotechnology[自然生物技术]20:889-894),并且可以用于产生本发明的TREM2结合抗体。

[0428] 还可以使用针对筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备人单克隆抗体。用于分离人抗体的这种噬菌体展示方法在本领域中建立或在以下实例中描述。参见例如:美国专利号5,223,409;5,403,484;和5,571,698(属于Ladner等人);美国专利号5,427,908和5,580,717(属于Dower等人);美国专利号5,969,108和6,172,197(属于McCafferty等人);以及美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081(属于Griffiths等人)。

[0429] 本发明的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠制备,人免疫细胞已经重建至该SCID小鼠中,使得免疫时可以产生人抗体应答。这种小鼠描述于Wilson等人的美国专利号5,476,996和5,698,767中。

[0430] 框架或Fc工程化

[0431] 本发明的工程化抗体及其抗原结合片段包括如下这些:其中已对VH和/或VL内的框架残基进行了修饰,例如以改善抗体的特性。通常进行这样的框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”为对应的种系序列。更确切地,已经历体细胞突变的抗体可以含有与衍生抗体的种系序列不同的框架残基。可以通过

将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定此类残基。为了使框架区序列恢复为其种系构型,可以通过例如定点诱变将体细胞突变“回复突变”为种系序列。此类“回复突变的”抗体也旨在为本发明所涵盖。

[0432] 另一种类型的框架修饰包括使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。此方法也称为“去免疫化”,并且在Carr等人的美国专利公开号20030153043中有进一步详细描述。

[0433] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或作为在框架或CDR区内进行的修饰的替代方案,可以将本发明的抗体工程化以包含Fc区内的修饰,通常是为了改变抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰的(例如,一个或多个化学部分可以附接至抗体)或被修饰以改变其糖基化,从而再次改变抗体的一种或多种功能特性。以下更详细地描述了这些实施例中的每一个。Fc区中残基的编号是卡巴特的EU索引的编号。

[0434] 在一个实施例中,修饰CH1的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。该方法在Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便例如促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[0435] 在另一个实施例中,使抗体的Fc铰链区突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入到Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域中,使得抗体具有相对于天然Fc铰链结构域SpA结合而言受损的葡萄球菌蛋白质A(SpA)结合。该方法在Ward等人的美国专利号6,165,745中进一步详细描述。

[0436] 在另一个实施例中,修饰抗体以增加其生物半衰期。可以采用各种方法。例如,可以引入以下突变中的一种或多种:T252L、T254S、T256F,如Ward的美国专利号6,277,375中所述。可替代地,为了增加生物半衰期,可以在CH1或CL区内改变抗体,以含有从IgG的Fc区的CH2结构域的两个环采集的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。

[0437] 在一个实施例中,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基置换一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中进一步详细描述。

[0438] 在另一个实施例中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基置换,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。该方法在Idusogie等人的美国专利号6,194,551中进一步详细描述。

[0439] 在另一个实施例中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法在Bodmer等人的PCT公开WO 94/29351中进一步描述。

[0440] 在一些实施例中,TREM2结合分子含有人IgG1恒定区。在一些实施例中,人IgG1恒定区包括Fc区。

[0441] 在一些实施例中,TREM2结合分子的Fc区包括一个或多个介导降低的或没有的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的突变。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基L234和L235被取代为A234和A235。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸

残基N267被取代为A267。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基D265和P329被取代为A265和A329。在某些实施例中,Fc区任选地包含赋予减少的效应子功能的突变或突变的组合,这些突变选自D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、和P329G/L234A/L235A中的任一个。在一些实施例中,Fc区包含赋予减少的效应子功能的突变或突变的组合,这些突变选自D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、和P329G/L234A/L235A中的任一个(所有位置依据EU编号)。

[0442] 在另一个实施例中,修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体对Fc-γ受体的亲和力。该方法由Presta在PCT公开WO 00/42072中进一步描述。此外,已经绘制了人IgG1上针对Fc-γRI、Fc-γRII、Fc-γRIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields,R.L.等人,2001J.Biol.Chen.[生物化学杂志]276:6591-6604)。例如,Fc区可以包含赋予增加的效应子功能的突变或突变的组合,这些突变选自S239D、I332E、A330L、S298A、E333A、E333S、K334A、K236A、K236W、F243L、P247I、D280H、K290S、R292P、S298D、S298V、Y300L、V305I、A339D、A339Q、A339T、P396L中的任一个(所有位置依据EU编号)。

[0443] 在还另一个实施例中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备非糖基化的抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,这导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对于抗原的亲和力。这样的方法在Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述。

[0444] 另外或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明这类改变的糖基化模式增加了抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中描述,并且可用作宿主细胞,在该宿主细胞中表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系LecI3细胞,其将岩藻糖附接至Asn(297)连接的碳水化合物的能力降低,还导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(还参见Shields,R.L.等人,2002J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开WO 99/54342描述了如下细胞系,该细胞系被工程化以表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如,β(1,4)-N乙酰基葡糖胺基转移酶III(GnTIII)),使得在工程化细胞系中表达的抗体显示出增加的二等分GlcNac结构,该二等分GlcNac结构导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人,1999Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-180)。

[0445] 在一些实施例中,TREM2结合分子是抗体。在一些实施例中,抗体具有IgG1同种型,其具有一个或多个突变(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一个或多个突变选自N297A、N297Q(BoltS等人(1993)Eur J Immunol[欧洲免疫学杂志]23:403-411)、D265A、L234A、L235A(McEarchern等人,(2007)Blood[血液],109:1185-1192)、C226S、

C229S(McEarchern等人,(2007)Blood[血液],109:1185-1192)、P238S(Davis等人,(2007)J Rheumatol[风湿病学杂志],34:2204-2210)、E233P、L234V(McEarchern等人,(2007)Blood[血液],109:1185-1192)、P238A、A327Q、A327G、P329A(Shields RL.等人,(2001)JBiol Chem.276(9):6591-604)、K322A、L234F、L235E(Hezareh等人,(2001)J Viral[病毒学杂志]75,12161-12168;Oganesyan等人,(2008).Acta Crystallographica[晶体学报]64,700-704)、P331S(Oganesyan等人,(2008)Acta Crystallographica[晶体学报]64,700-704)、T394D(Wilkinson等人(2013)MAbs 5(3):406-417)、A330L、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU或卡巴特编号惯例。在某些实施例中,根据EU或卡巴特编号惯例,Fc区还在对应于甘氨酸236的位置处包含氨基酸缺失。

[0446] 在一些实施例中,根据EU或卡巴特编号惯例,抗体具有IgG1同种型,该IgG1同种型具有重链恒定区,该重链恒定区含有C220S突变。

[0447] 在一些实施例中,Fc区进一步含有选自以下的一个或多个另外的突变:A330L、L234F、L235E、和/或P331S(根据EU或卡巴特编号惯例)。

[0448] 在某些实施例中,抗体具有IgG2同种型。在一些实施例中,抗体含有人IgG2恒定区。在一些实施例中,人IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施例中,Fc区包含一个或多个修饰。例如,在一些实施例中,Fc区包含一个或多个突变(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一个或多个突变选自V234A、G237A、H268E、V309L、N297A、N297Q、A330S、P331S、C232S、C233S、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置是根据EU或卡巴特编号惯例进行的。

[0449] 在某些实施例中,抗体具有IgG4同种型。在一些实施例中,抗体含有人IgG4恒定区。在一些实施例中,人IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施例中,Fc区包含一个或多个修饰。例如,在一些实施例中,Fc区包含一个或多个突变(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施例中,该一个或多个突变选自E233P、F234V、L235A、G237A、E318A(Hutchins等人(1995)Proc Nat/A cad Sci USA[美国国家科学院院刊],92:11980-11984)、S228P、L236E、S241P、L248E(Reddy等人,(2000)J Immuno/[免疫学杂志],164:1925-1933;Angal等人,(1993)Mol Immunol.[分子免疫学]30(1):105-8;US 8614299 B2)、T394D、M252Y、S254T、T256E、N297A、和/或N297Q,其中氨基酸位置是根据EU或卡巴特编号惯例进行的。

[0450] 在一些实施例中,Fc区还含有一个或多个选自M252Y、S254T和/或T256E的其他突变,其中氨基酸位置根据EU或卡巴特编号惯例。

[0451] 在一些实施例中,本文所述的一种或多种IgG1变体可与A330L突变组合(Lazar等人,(2006)Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊],103:4005-4010),或与L234F、L235E、和/或P331S突变中的一种或多种组合(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊],105:20167-20172)以消除补体活化,其中氨基酸位置根据EU或卡巴特编号惯例。在一些实施例中,本文所述的IgG变体可与一种或多种突变(例如根据EU或卡巴特编号惯例,M252Y、S254T、T256E突变)组合以增强人血清中的抗体半衰期(Dall'Acqua等人,(2006)J Biol Chem,281:23514-23524;和Strohl等人,(2009)Current Opinion in Biotechnology[生物技术当前述评],20:685-691)。

[0452] 在一些实施例中,本披露的IgG4变体可以与S228P突变(根据EU或Kabat编号惯例)组合(Angal等人,(1993)Mol Immunol[分子免疫学],30:105-108),和/或与Peters等人

((2012)J Biol Chem.[生物化学杂志]13;287(29):24525-33)中描述的一个或多个突变组合以增强抗体稳定性。

[0453] 在一些实施例中,抗体具有如下Fc区,该Fc区选自IgG2 Fc区、IgG4 Fc区、或IgG2/IgG4杂合Fc区。

[0454] 工程化改变的抗体的方法

[0455] 如上所述,本文所示的具有VH和VL序列或全长重链和轻链序列的TREM2结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、VH和/或VL序列或与其附接的一个或多个恒定区来产生新的TREM2结合抗体。因此,在本发明的另一个方面,本发明的TREM2结合抗体的结构特征用于产生结构上相关的TREM2结合抗体,其保留本发明的抗体及其抗原结合片段的至少一种功能特性,如与人TREM2结合并且稳定人TREM2的功能特性。

[0456] 例如,本发明的抗体及其抗原结合片段的一个或多个CDR区或其突变可以与已知的构架区和/或其他CDR重组组合以产生另外的重组工程化的本发明TREM2结合抗体及其抗原结合片段,如上所讨论。其他类型的修饰包括先前部分中描述的那些修饰。用于工程化方法的起始材料是本文提供的一种或多种VH和/或VL序列,或其一个或多个CDR区。为了产生工程化抗体,不必实际制备(即,表达为蛋白质)具有本文提供的一种或多种VH和/或VL序列的抗体,或其一个或多个CDR区。相反,该一个或多个序列中包含的信息用作起始材料以产生源自该一个或多个原始序列的一个或多个“第二代”序列,然后该一个或多个“第二代”序列进行制备并表达为蛋白质。

[0457] 还可以通过筛选具有如US20050255552所述的固定的CDR3序列或最小必需结合决定簇以及CDR1和CDR2序列的多样性的抗体文库来制备改变的抗体序列。所述筛选可以根据适合于筛选来自抗体文库的抗体的任何筛选技术进行,如噬菌体展示技术。

[0458] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。由一种或多种改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述的TREM2结合抗体的一种、一些或全部功能特性的抗体,所述功能特性包括但不限于与人TREM2蛋白特异性结合并稳定人TREM2蛋白。

[0459] 可以使用本领域可获得的和/或本文描述的标准测定如实例中所述的那些测定(例如,ELISA)评估改变的抗体的功能特性。

[0460] 在一些实施例中,使本发明的抗体及其抗原结合片段工程化的方法中,可以沿着TREM2结合抗体编码序列的全部或部分随机或选择性地引入突变,并且可以针对结合活性和/或如本文所述的其他功能特性筛选所得的经修饰的TREM2结合抗体。本领域中已经描述了突变方法。例如,Short的PCT公开WO 02/092780描述了使用饱和诱变、合成连接装配、或其组合产生并筛选抗体突变的方法。可替代地,Lazar等人的PCT公开WO 03/074679描述了使用计算筛选方法来优化抗体的生理化学特性的方法。

[0461] 本发明抗体的表征

[0462] 本发明的抗体及其抗原结合片段可通过各种功能测定来表征。例如,它们的特征在于它们结合和稳定TREM2的能力。

[0463] 抗体与TREM2结合的能力可以通过直接标记目的抗体来检测,或者该抗体可以是未标记的并且使用本领域已知的各种夹心式测定形式间接检测结合。

[0464] 在一些实施例中,本发明的TREM2结合抗体及其抗原结合片段阻断参考TREM2结合抗体或与参考TREM2结合抗体竞争结合TREM2多肽。这些可以是上述完全人或人源化TREM2

结合抗体。它们还可以是与参考抗体结合相同表位的其他人、小鼠、嵌合或人源化TREM2结合抗体。阻断参考抗体结合或与参考抗体竞争结合的能力表明测试中的TREM2结合抗体结合与参考抗体所定义的相同或相似的表位,或结合与参考TREM2结合抗体所结合的表位足够接近的表位。这种抗体尤其可能具有针对参考抗体鉴定的有利特性。阻断参考抗体或与参考抗体竞争的能力可以通过例如竞争结合测定来确定。使用竞争结合测定,检查所述测试中的测抗体抑制参考抗体与共同抗原(如TREM2多肽)的特异性结合的能力。如果过量的测试抗体实质上抑制参考抗体的结合,则测试抗体与参考抗体竞争与抗原的特异性结合。实质性抑制意指测试抗体通常使参考抗体的特异性结合降低至少10%、25%、50%、75%或90%。

[0465] 许多已知的竞争结合测定可用于评估抗体与参考抗体竞争结合特定蛋白质,该特定蛋白质在这种情况下是TREM2。这些测定法包括,例如固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心式竞争测定(参见Stahli等人,Methods in Enzymology[酶学方法]9:242-253,1983);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland等人,J.Immunol.[免疫学杂志]137:3614-3619,1986);固相直接标记测定,固相直接标记夹心式测定(参见Harlow和Lane,同上);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Mol.Immunol.[分子免疫学]25:7-15,1988);固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung等人,Virology[病毒学]176:546-552,1990);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.[斯堪的纳维亚免疫学杂志]32:77-82,1990)。典型地,这种测定涉及使用结合固体表面或细胞的纯化抗原,该固体表面或细胞携带这些未标记的测试TREM2结合抗体和标记的参考抗体中的任何一种。通过确定在测试抗体存在下结合固体表面或细胞的标签的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗体过量存在。通过竞争测定(即,竞争抗体)鉴定的抗体包括与参考抗体结合相同表位的抗体和结合邻近表位的抗体,该邻近表位与参考抗体所结合的表位足够接近以发生位阻。

[0466] 为了确定所选择的TREM2结合单克隆抗体是否结合唯一的表位,可以使用可商购获得的试剂(例如来自伊利诺伊州罗克福德的皮尔斯公司(Pierce,Rockford,Ill.)的试剂)将每种抗体生物素化。可以使用TREM2多肽包被的ELISA平板来进行使用未标记单克隆抗体和生物素化单克隆抗体的竞争研究。可以用链霉亲和素-碱性磷酸酶探针检测生物素化的MAb结合。为了确定纯化的TREM2结合抗体的同种型,可以进行同种型ELISA。例如,可以用1μg/ml抗人IgG在4℃下过夜包被微量滴定板的孔。在用1% BSA封闭之后,将这些板与1μg/ml或更少的单克隆TREM2结合抗体或经纯化的同种型对照在环境温度下反应1至2个小时。这些孔然后可以与人IgG1或人IgM特异性碱性磷酸酯酶缀合的探针反应。然后将板显色,并对其进行分析,以便确定纯化抗体的同种型。

[0467] 为了证明单克隆TREM2结合抗体与表达TREM2多肽的肝细胞的结合,可以使用流式细胞术。简而言之,可以将表达TREM2的细胞系(在标准生长条件下生长)与各种浓度的TREM2结合抗体在含0.1% BSA和10%胎牛血清的PBS中混合,并且在37℃下孵育1小时。洗涤后,使细胞与荧光素标记的抗人IgG抗体在与一级抗体染色相同的条件下反应。可通过FACScan仪器使用光和侧向散射特性门控单个细胞来分析样品。(除了或者替代)流式细胞术测定,还可使用利用荧光显微术的备选测定法。可将细胞如上所述那样染色并且通过荧光显微术检查。该方法允许可视化单个细胞,但可以根据抗原的密度具有降低的灵敏度。

[0468] 可以通过蛋白质印迹进一步测试本发明的TREM2结合抗体及其抗原结合片段与TREM2多肽或抗原片段的反应性。简而言之,可以制备纯化的TREM2多肽或融合蛋白,或来自表达TREM2的细胞的细胞提取物,并且进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,将分离的抗原转移至硝酸纤维素膜,用10%胎牛血清进行封闭,并且用有待测试的单克隆抗体进行探测。可以使用抗人IgG碱性磷酸酯酶检测人IgG结合,并且用BCIP/NBT底物片剂(密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司(Sigma Chem.Co.,St.Louis,Mo.))进行显色。

[0469] 功能测定的实例也在下面的实例部分中描述。

[0470] 治疗方法

[0471] 本文提供了通过使用本文公开的TREM2结合分子治疗与TREM2功能丧失相关的疾病的方法。在一些实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病是神经炎症或神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、如尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)和黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。在一些优选的实施例中,与TREM2功能丧失相关的疾病选自以下清单,该清单有以下组成:阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病。

[0472] 本文还提供了通过使用本文披露的TREM2结合分子治疗直接或间接与异常TREM2活性和/或表达相关的TREM2相关障碍的方法。Trem2相关障碍包括CNS相关疾病、PNS相关疾病、全身性炎症和其他与炎症有关的疾病、疼痛和由于滥用化学物质引起的戒断症状,与CNS相关的疾病或障碍包括广泛性焦虑障碍、认知障碍、学习和记忆缺陷和功能障碍、阿尔茨海默病(轻度、中度和重度)、注意力缺陷和多动障碍、帕金森病、帕金森病痴呆、亨廷顿病、ALS、慢性神经退行性障碍、如Creutzfeld-Jacob病和kuru病、抽动一秽语综合征、精神病、抑郁症和抑郁障碍、躁狂症、躁狂抑郁症、精神分裂症、精神分裂症的认知缺陷、强迫症、恐慌症、饮食障碍、发作性睡病、伤害感受、AIDS-痴呆、老年性痴呆、与年龄相关的轻度认知障碍(MCI)、年龄相关记忆障碍、孤独症、阅读障碍、迟发性运动障碍、癫痫、和惊厥性疾病、创伤后应激障碍、短暂性缺氧、假性痴呆、月经前期综合征、黄体晚期综合征、慢性疲劳综合征和时差。在一些优选的实施例中,Trem2相关障碍选自以下清单,该清单由以下组成:阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病。

[0473] Trem2相关疾病还包括:免疫障碍、特别是涉及炎性障碍(如细菌感染、真菌感染、病毒感染、原生动物或其他寄生虫感染、银屑病、败血症、脑疟疾、炎症性肠病、关节炎、(如类风湿性关节炎)、毛囊炎、脓疱疮、肉芽肿、类脂肺炎、血管炎、和骨关节炎)、自身免疫障碍(如类风湿性关节炎、甲状腺炎、(如桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯病)、胰岛素抗性糖尿病、恶性贫血、艾迪生病、天疱疮、白癜风、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮(SLE))、干燥综合征、多发性硬化、皮肌炎、混合性结缔组织病、硬皮病、多发性肌炎、移植排斥反应、(如同种异体移植排斥反应)、T细胞障碍(如艾滋病)、过敏性炎症性障碍(如皮肤和/或粘膜过敏,如过敏性鼻炎、哮喘、牛皮癣)、神经系统障碍、眼障碍、胚胎障碍或与TREM2异常活性和/或表达直接

或间接相关的任何其他障碍(例如肿瘤、癌症、白血病、髓性疾病和创伤)。

[0474] 在一些实施例中,TREM2相关障碍是由TREM2的广泛蛋白水解切割或表达TREM2受体异常或突变变体的细胞介导的或与之相关的自身免疫障碍、炎性障碍或恶性障碍。自身免疫疾病的实例包括但不限于关节炎(例如类风湿性关节炎,慢性关节炎和畸形性关节炎)和风湿性疾病,包括炎性病症和涉及骨损失的风湿性疾病、炎性疼痛、脊柱炎(包括强直性脊柱炎)、莱特尔综合征、反应性关节炎、银屑病关节炎和肠道型关节炎(enterophathic arthritis)、超敏反应(包括气道超敏反应和皮肤超敏反应)和过敏症。自身免疫疾病包括自身免疫性血障液碍(包括例如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞性贫血和特发性血小板减少症)、系统性红斑狼疮、炎性肌紊乱、多软骨炎、巩膜瘤、韦格纳肉芽肿病、皮肌炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、银屑病、史蒂芬强森综合征、特发性口炎性腹泻、内分泌性眼病、格雷夫斯病、结节病、多发性硬化、原发性胆汁性肝硬化、青少年糖尿病(I型糖尿病)、葡萄膜炎(前部和后部)、干燥性角膜结膜炎和春季角膜结膜炎、间质性肺纤维化、银屑病关节炎和肾小球肾炎(有和没有肾病综合征,例如包括痛风、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、特发性肾病综合征或微小病变肾病)、肿瘤、皮肤和角膜炎症、肌炎、骨植入物松动、代谢紊乱、如动脉粥样硬化、糖尿病和脂代谢紊乱。

[0475] 在一些实施例中,TREM2相关障碍选自哮喘、支气管炎、肺尘埃沉着病、肺气肿、气道的其他阻塞性或炎性疾病,包括特发性肺纤维化或COPD。

[0476] 在一些实施例中,TREM2相关障碍是造血或肝细胞恶性障碍,例如急性髓性白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生性障碍、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、范可尼贫血(fanconi anemi)、重型地中海贫血症、威-奥二氏综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)、噬红细胞性淋巴细胞与组织细胞增多症。

[0477] 在一些实施例中,TREM2相关病症选自哮喘、脑炎、炎症性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏障碍、败血性休克、肺纤维化、未分化的脊椎关节炎(undifferentitated spondyloarthropathy)、未分化的关节炎、关节炎、炎症性骨质溶解或由慢性病毒性或细菌性感染所致的慢性炎症。

[0478] 在一些实施例中,TREM2相关障碍选自痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、混合性痴呆、克雅氏病、正常压力脑积水、肌萎缩侧索硬化、亨廷顿病、tau蛋白病、那须-哈科拉病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急慢性结肠炎、伤口愈合、克罗恩病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森病、路易体痴呆、多系统萎缩、多系统萎缩综合征(Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿性疾病、结节病、衰老疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼感染、全身性感染、狼疮、关节炎、多发性硬化、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨硬化病(osteopetrotic disease)、佩吉特骨病(Paget's disease of bone)和癌症。在一些优选的实施例中,TREM2相关障碍选自以下清单,该清单由以下组成:阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化或那须-哈科拉病。

[0479] 在一些实施例中,TREM2相关障碍选自痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、那须-哈科拉病和多发性硬化。在一些优选的实施例中,TREM2相关障碍是痴呆,例如额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病、血管性痴呆、语义性痴呆或具路易体痴呆。

[0480] 在一些实施例中,此类方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域(例如,SEQ ID NO:1、2和3中任一个的氨基酸残基19至132)的抗体或其抗原结合片段并稳定TREM2蛋白。

[0481] 在一些实施例中,治疗与TREM2功能丧失相关的疾病的这些方法包括:(1)测定从受试者获得的样品(例如从受试者获得的脑脊液样品)中的细胞表面TREM2水平;(2)选择细胞表面TREM2水平低于参考水平的受试者,其中参考水平是从健康受试者获得的样品(例如从健康受试者获得的脑脊液样品)中的细胞表面TREM2水平;和(3)给受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域并稳定TREM2蛋白。特异性结合TREM2蛋白的IgSF结构域的抗体或其抗原结合片段可以稳定细胞表面上的TREM2蛋白,和/或减少TREM2蛋白的胞外域的脱落。这些抗体或其抗原结合片段可以通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用受试者。样品中的细胞表面TREM2水平可以通过本领域已知的测定法确定,例如通过流式细胞术、免疫组织化学、蛋白质印迹、免疫荧光测定、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、均相时间分辨荧光(HTRF)、正电子发射断层扫描(PET)、或用针对TREM2的抗体或抗体片段的任何其他免疫检测。

[0482] 组合疗法

[0483] 上述各种治疗可以与其他治疗配伍组合,例如与TREM2功能丧失相关的疾病的当前护理标准,例如,阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、或那须-哈科拉病的当前护理标准。例如,本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段可以与BACE抑制剂、抗Tau抗体、抗淀粉样蛋白β抗体、芬戈莫德、BG12、干扰素β或那他珠单抗中的一种或多种组合。因此,本文所述的治疗与TREM2功能丧失相关的疾病的方法可以进一步包括向需要治疗的受试者施用第二药剂。

[0484] 术语“组合”是指呈一种剂量单位形式的固定组合,或组合施用(其中本发明的化合物与组合配偶体(partner)(例如下文所解释的另一种药物,也称为“治疗剂”或“共药剂(co-agent)”)可以在同一时间独立地施用或在时间间隔内分开地施用,特别是在这些时间间隔允许组合配偶体显示协作(例如协同)效应的情况下)。单个组分可以包装在一个试剂盒中或分开包装。可在施用之前将一种或两种组分(例如粉末或液体)重构或稀释至所希望的剂量。如本文所使用的术语“共同施用”或“组合施用”等意在涵盖将所选择的组合配偶体施用给有需要的单个受试者(例如患者),并且旨在包括其中药剂不一定通过相同的施用途径施用或同时施用的治疗方案。如本文所用,术语“药物组合”意指由多于一种治疗剂的混合或组合所产生的产品,并且包括治疗剂的固定和非固定组合两者。术语“固定组合”意指治疗剂(例如,本发明的化合物和组合配偶体)以单一实体或剂量的形式同时地施用至患者。术语“非固定组合”意指治疗剂(例如,本发明的化合物和组合配偶体)作为分开的实体同时地、并行地或依序地施用至患者(没有特定的时间限制),其中这种施用在患者体内提供治疗有效水平的两种化合物。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如三种或更多种治疗剂的施用。

[0485] 如本文所用,术语“药物组合”是指在一个剂量单位形式中的固定组合、或用于组合施用的非固定组合或成套药盒,其中两种或更多种治疗剂可以在同一时间独立地施用或在时间间隔内分别施用,特别地其中这些时间间隔允许组合配偶体显示合作性例如协同效

应。

[0486] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗本披露中描述的治疗性病症或障碍。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,如以具有固定比率的活性成分的单个胶囊施用。可替代地,这种施用涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器(例如,片剂、胶囊、粉末、和液体)中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所希望的剂量。此外,这种施用也涵盖在大致相同的时间或在不同的时间以依序方式使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗本文所述的病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。

[0487] 样品制备

[0488] 可以使用本领域已知的任何一种方法(例如通过活检或手术)从受试者获得本文所述方法中使用的样品。例如,可以通过腰椎穿刺获得包含脑脊液的样品,其中将附接到注射器的细针插入腰部区域中的椎管中并且产生真空以使得脑脊液可以通过针吸入并且收集在注射器中。CT成像、超声波或内窥镜可用于指导此类手术。样品可以快速冷冻并储存在-80℃以备后用。样品也可以用固定剂(例如甲醛、多聚甲醛或乙酸/乙醇)固定。可以从新鲜、冷冻或固定的样品中提取RNA或蛋白质用于分析。

[0489] 药物组合物、剂量和施用方法

[0490] 本文还提供了用于治疗TREM2相关疾病的组合物,例如药物组合物。此类组合物包括一种或多种如本文所述的hTREM2抗体或其抗原结合片段。此类组合物可以进一步包含另一种药剂,例如当前针对待治疗疾病的护理标准。

[0491] 药物组合物典型地包含药学上可接受的载体。如本文所用,表达“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。典型地,药物组合物被配制成与预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外(例如,静脉内、动脉内、腹膜内)、口服、颅内、鞘内、或鼻内(例如,吸入)、皮内、皮下、或透粘膜施用。在一些实施例中,配制药物组合物以递送hTREM2抗体或其抗原结合片段以穿过血脑屏障。

[0492] 在一些实施例中,这些药物组合物包含一种或多种药学上可接受的载体,包括例如,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白)、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡类、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0493] 配制适合的药物组合物的方法在本领域中是已知的,参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy.[雷明顿:药物科学与实践]第21版.,2005;和在Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs[药物和药物科学:一系列教科书和专著](Dekker,NY)系列中的书籍。例如,被用于胃肠外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;并且用于调节渗透压的试剂如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱(例如盐酸或氢氧

化钠)调节pH。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0494] 适合于可注射使用的药物组合物可以包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体、以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内的施用,适当的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(巴斯夫公司(BASF),帕西波尼(Parsippany),新泽西州(NJ))或磷酸酯缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,该组合物必须是无菌的并且必须具有达到容易注射的程度的流动性。它在制造和储存条件下应该稳定并且必须抗诸如细菌和真菌的微生物污染作用而保存。该载体可以是包含以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),以及其适合的混合物。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌以及抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂例如糖、多元醇(如甘露醇或山梨糖醇)和氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的长时间吸收。

[0495] 可以通过以下各项来制备无菌可注射溶液:将活性化合物以所需的量,根据需要,与一种以上列举的成分或这些成分的组合并入适当的溶剂中,然后进行过滤灭菌。

[0496] 总体上,通过将有效化合物掺入无菌媒介物来制备分散体,该无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上列举的所需其他成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这些方法产生活性成分的粉末以及来自其以前的无菌过滤溶液的任何另外的所希望的成分。

[0497] 胃肠外配制品可以是单次推注剂量,输注或加载推注剂量,然后是维持剂量。这些组合物能以特定的固定或可变间隔(例如,每天一次)施用,或"按需"施用。

[0498] 用于注射的合适的药物组合物可以包含缓冲液(例如,乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液);表面活性剂(例如聚山梨醇酯);任选的稳定剂(例如,人白蛋白)等。外周施用的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射用有机酯如油酸乙酯。含水载体包括例如水、醇/水溶液、乳剂或悬液,包括盐水和缓冲的介质。在一些实施例中,该药物组合物包含0.01-0.1M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其他常见的胃肠外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内媒介物可以包括流体和营养补充物、电解质补充物,如基于Ringer右旋糖的那些等。防腐剂和其他添加物也可以存在,如,例如抗微生物药、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体等。

[0499] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。出于口服治疗性施用的目的,可以将活性化合物随赋形剂一起掺入并且以片剂、锭剂或胶囊剂(例如,明胶胶囊剂)的形式使用。口服组合物还可以使用用作嗽口水的液体载体来制备。可以包括药学上相容的粘合剂、和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一种:粘合剂,如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;崩解剂,如海藻酸、普拉莫胶(Primogel)、或玉米淀粉;润滑剂,如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotes);助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;或调味剂,如薄荷、水杨酸甲酯、或橙味调味品。

[0500] 对于通过吸入施用,化合物可以从加压容器或分配器(其含有合适的推进剂,例如气体(如二氧化碳))、或喷雾器以气溶胶喷雾形式递送。此类方法包括美国专利号6,468,798中描述的那些方法。如本文描述的治疗化合物的全身施用也可以通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮施用而言,可以在配制品中使用对待渗透的屏障适当的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的,并且包括例如就经粘膜施用而言,洗涤剂、胆盐、以及梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷剂或栓剂来完成。对于经皮给药,将活性化合物配制成如本领域通常已知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂、或乳膏剂。

[0501] 在一个实施例中,将这些治疗性化合物与保护这些治疗性化合物免于从体内快速消除的载体一起制备,如控释配制品,包括植入物和微囊化的递送系统。

[0502] 药物组合物可以与给药的说明书一起包括在容器、包装、或分配器中。

[0503] 在非限制性实例中,将包含至少一种药剂的药物组合物配制成液体(例如,热固性液体),配制成固体的组分(例如,粉末或可生物降解的生物相容性聚合物(例如,阳离子可生物降解的生物相容性聚合物)),或配制成凝胶的组分(例如,可生物降解的生物相容性聚合物)。在一些实施例中,将含有至少一种药剂的该至少组合物配制成选自下组的凝胶:海藻酸盐凝胶(例如,海藻酸钠)、纤维素基凝胶(例如,羧甲基纤维素或羧乙基纤维素)、或壳聚糖基凝胶(例如,壳聚糖甘油磷酸盐)。此外,可用于配制本文描述的任何药物组合物的药物洗脱聚合物的另外的非限制性实例包括角叉菜胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、与聚乙烯醇组合的葡聚糖、与聚丙烯酸组合的葡聚糖、聚半乳糖醛酸、半乳糖醛酸多糖、polysalactic酸、聚乙醇酸、罗望子胶、黄原胶、纤维素胶、瓜尔胶(羧甲基瓜尔胶)、果胶、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、N-异丙基聚丙烯酰胺(N-isopropylpolyacrylomide)、聚氧乙烯、聚氧丙烯、普朗尼克酸(pluronic acid)、聚乳酸、环糊精、环状直链淀粉、节肢弹性蛋白(resilin)、聚丁二烯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HP MA)共聚物、马来酸酐-烷基乙烯基醚、聚缩肽、聚羟基丁酸酯、聚己内酯、聚二噁烷酮、聚乙二醇、聚有机膦腈、聚原酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸-共-羟基乙酸(PLGA)、聚酸酐、聚胺(polysilamine)、聚N-乙烯基己内酰胺、和结冷胶。

[0504] “有效量”是足以实现有益或所希望的结果的量。例如,治疗量为达到所需疗效的量。所述量可与预防上有效量相同或不同,所述预防上有效量为预防疾病或疾病症状的发作所需的量。可以在一次或多次施用或应用或给药时施用有效量。治疗化合物的治疗有效量(即,有效剂量)取决于所选择的治疗化合物。组合物能以从每天一次或多次至每周一次或多次施用;包括每隔一天一次。技术人员将理解,某些因素可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时程,包括但不限于疾病或障碍的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄,以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的在此描述的治疗化合物对受试者进行的治疗可以包括单一治疗或一系列治疗。

[0505] 可以通过细胞培养或实验动物中的标准制药程序来确定治疗性化合物的剂量、毒性和治疗效果,例如,用于确定LD50(使50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的患者群体中治疗有效的剂量)。在毒性和治疗效果之间的剂量比为治疗指数,它可以表示为比率LD50/ED50。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管可以使用表现出有毒副作用的化合物,但是应该小心设计将此类化合物靶向至受影响的组织的部位的递送系统,从而将对未感染的细胞的潜在损伤最小化,并且由此减少副作用。

[0506] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制一系列的用于在人类中使用的剂量。优选此类化合物的剂量处于包括ED50在内的有很小毒性或没有毒性的循环浓度范围内。所述剂量可根据所应用的剂型和所使用的施用途径在该范围内变化。对于用于本发明方法的任何化合物,均可根据细胞培养测定初步估计治疗有效剂量。一种剂量可以在动物模型中被配制以达到在细胞培养中确定的一种循环血浆浓度范围,该范围包括IC50(即该测试化合物的完成半最大症状的抑制的浓度)。此类信息可用于更精确地确定在人中有用的剂量。可以例如通过高效液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0507] 试剂盒

[0508] 本文还提供了试剂盒,该试剂盒包括一种或多种本文提供的组合物和使用说明书。使用说明书可以包括诊断或治疗TREM2相关疾病的说明。如本文提供的试剂盒可以根据本文描述的任何方法使用。本领域技术人员将知道本文提供的试剂盒的其他合适用途,并且将能够针对此类用途使用该试剂盒。本文提供的试剂盒还可以包括邮寄(例如,邮资支付信封或邮寄包),其可以用于将样品返回用于分析,例如,返回实验室。试剂盒可以包括一个或多个用于样品的容器,或样品可以在标准血液收集瓶中。试剂盒还可以包括以下的一种或多种:知情同意书,试验申请表和关于如何在本文所述方法中使用试剂盒的说明。本文还包括使用此类试剂盒的方法。可以对一个或多个表格(例如,测试申请表)和装有样品的容器进行编码,例如,用条形码来鉴定提供样品的受试者。

[0509] 本领域技术人员将认识到许多类似于或等同于本文所述那些的方法和材料,这些方法和材料可用于实践本发明。实际上,本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0510] 实施方式

[0511] 1.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与人髓系细胞触发受体2(hTREM2)蛋白的免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域结合并稳定hTREM2蛋白(例如,SEQ ID NO:1、2或3)。

[0512] 2.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46、R47、H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75、R77、D87、T88、L89和G90。

[0513] 3.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,一个或多个选自以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,和一个或多个选自以下组成的组的残基:hTREM2的D87、T88、L89和G90。

[0514] 4.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合五个或更多个选自以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,四个或更多个选自以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,和三个或更多个选自以下组成的组的残基:hTREM2的D87、T88、L89和G90。

[0515] 5.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合七个或更多个选自以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,四个或更多个选自以下组成的组的残基:H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,和三个或更多个选自以下组成的组的残基:hTREM2的D87、T88、L89和G90。

[0516] 6.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合

五个或更多个选自以下组成的组的残基:D39、S40、M41、K42、W44、G45、R46和R47,所有残基H67、N68、L69、W70、L71、L72、F74、L75和R77,和三个或更多个选自以下组成的组的残基:hTREM2的D87、T88、L89和G90。

[0517] 7.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0518] 8.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0519] 9.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0520] 10.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合四个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0521] 11.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合五个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0522] 12.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合六个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0523] 13.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合七个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0524] 14.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合八个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0525] 15.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合九个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0526] 16.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88和L89。

[0527] 17.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和G90。

[0528] 18.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和G90。

[0529] 19.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的D39、K42、R46和

G90。

[0530] 20.如实施例7至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基D39、K42、R46和G90。

[0531] 21.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88、L89、D39、K42、R46和G90。

[0532] 22.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合一个或多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0533] 23.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合两个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0534] 24.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合三个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0535] 25.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合四个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0536] 26.如实施例7至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合五个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0537] 27.如实施例7至15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合六个或更多个选自下组的残基,该组由以下组成:hTREM2的R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0538] 28.如实施例1所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2的所有残基S40、M41、W44、G45、W70、L71、L72、F74、T88、L89、R47、H67、N68、L69、L75、R77和D87。

[0539] 29.如实施例1至28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段活化hTREM2。

[0540] 30.如实施例1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段促进表达TREM2的细胞中的一种或多种hTREM2依赖性生理活性。

[0541] 31.如实施例1至30中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段:

[0542] a)增加吞噬作用,例如在表达hTREM2的细胞中增加吞噬作用,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2A巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞样细胞,

[0543] b)增加趋化性,例如在表达hTREM2的细胞中增加趋化性,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2a巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞样细胞,

[0544] c)增加人单核细胞系中NFAT驱动的报告基因活性,

[0545] d)增加Syk磷酸化,例如在表达hTREM2的细胞中增加Syk磷酸化,例如,其中该表达TREM2的细胞是hM2A巨噬细胞,或

[0546] e)增加a)至d)中两项或更多项的任何组合。

[0547] 32.如实施例1至31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2,例如结合细胞表面上的hTREM2,其中例如通过FACS分析对hM2a巨噬细胞所测量,半最大有效浓度(EC_{50})是1nM或更低。

[0548] 33.如实施例1至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2,例如结合细胞表面上的hTREM2,其中例如通过FACS分析对hM2a巨噬细胞所测量,半最大有效浓度(EC_{50})是0.59nM或更低。

[0549] 34.如实施例1至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过表面等离子体共振(SPR)测量,该抗体或其抗原结合片段以150pM或更低的解离常数(K_D)结合hTREM2。

[0550] 35.如实施例1至34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中例如通过表面等离子体共振(SPR)测量,该抗体或其抗原结合片段以50pM或更低的解离常数(K_D)结合hTREM2。

[0551] 36.如实施例1至35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段使表达hTREM2的细胞的细胞表面上的hTREM2蛋白稳定。

[0552] 37.如实施例36所述的抗体或其抗原结合片段,其中该表达hTREM2的细胞是巨噬细胞例如M2a巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、小胶质细胞、肥大细胞、单核细胞、肺上皮细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、中性粒细胞或肝癌细胞。

[0553] 38.如实施例1至37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段在hM2A巨噬细胞中以100nM或更低的浓度减少hTREM2蛋白的胞外域的脱落。

[0554] 39.如实施例1至38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中TREM2细胞表面表达增加3倍或更高。

[0555] 40.如实施例1至39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中hTREM2的IgSF结构域包含SEQ ID NO 1、2和3中任一个的氨基酸残基19至132。

[0556] 41.如实施例1至40中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0557] a)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:46,或SEQ ID NO:48;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:49;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:60;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:58;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:59;

[0558] b)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:19或SEQ

ID NO:22;

[0559] c)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79;或

[0560] d)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:91;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:92;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:103;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:101;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:102。

[0561] 42.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段结合hTREM2蛋白的IgSF结构域,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0562] a)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:46,或SEQ ID NO:48;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:49;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:60;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:58;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:59;

[0563] b)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:22;

[0564] c)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:23;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:78或SEQ ID NO:79;或

[0565] d)重链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:87

或SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90;重链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:91;重链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:92;轻链可变区CDR1,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:103;轻链可变区CDR2,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:101;以及轻链可变区CDR3,其包含以下,例如由以下组成:SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:102。

[0566] 43.如实施例1至42中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

[0567] a)与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:50具有至少95%序列同一性的VH多肽序列,和与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:61具有至少95%序列同一性的VL多肽序列;或

[0568] b)与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:93具有至少95%序列同一性的VH多肽序列,和与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:104具有至少95%序列同一性的VL多肽序列。

[0569] 44.如实施例1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0570] a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:7,例如由SEQ ID NO:7组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

[0571] b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:44,例如由SEQ ID NO:44组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:42,例如由SEQ ID NO:42组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:54,例如由SEQ ID NO:54组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:55,例如由SEQ ID NO:55组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

[0572] c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:7,例如由SEQ ID NO:7组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

[0573] d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:87,例如由SEQ ID NO:87组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:85,例如由SEQ ID NO:85组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:97,例如由SEQ ID NO:97组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:98,例如由SEQ ID NO:98组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

[0574] 45.如实施例1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0575] a)SEQ ID NO:8的重链可变区CDR1;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:9,例如由SEQ ID NO:9组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:20,例如由SEQ ID NO:20组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ

ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:22,例如由SEQ ID NO:22组成;

[0576] b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:45,例如由SEQ ID NO:45组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:46,例如由SEQ ID NO:46组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:57,例如由SEQ ID NO:57组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:58,例如由SEQ ID NO:58组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:59,例如由SEQ ID NO:59组成;

[0577] c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:8,例如由SEQ ID NO:8组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:9,例如由SEQ ID NO:9组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:20,例如由SEQ ID NO:20组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:79,例如由SEQ ID NO:79组成;或

[0578] d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:88,例如由SEQ ID NO:88组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:89,例如由SEQ ID NO:89组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:100,例如由SEQ ID NO:100组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:101,例如由SEQ ID NO:101组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:102,例如由SEQ ID NO:102组成。

[0579] 46.如实施例1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0580] a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:10,例如由SEQ ID NO:10组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:11,例如由SEQ ID NO:11组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:12,例如由SEQ ID NO:12组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:23,例如由SEQ ID NO:23组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

[0581] b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:47,例如由SEQ ID NO:47组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:48,例如由SEQ ID NO:48组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:49,例如由SEQ ID NO:49组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:60,例如由SEQ ID NO:60组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:58,例如由SEQ ID NO:58组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

[0582] c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:10,例如由SEQ ID NO:10组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:11,例如由SEQ ID NO:11组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:12,例如由SEQ ID NO:12组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:23,例如由SEQ ID NO:23组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:21组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

[0583] d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:90,例如由SEQ ID NO:90组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:91,例如由SEQ ID NO:91组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:92,例如由SEQ ID NO:92组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:103,例如由SEQ ID NO:103组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:101,例如由SEQ ID NO:101组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

[0584] 47.如实施例1至43中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0585] a)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:4,例如由SEQ ID NO:4组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:19,例如由SEQ ID NO:19组成;

[0586] b)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:41,例如由SEQ ID NO:41组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:42,例如由SEQ ID NO:42组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:43,例如由SEQ ID NO:43组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:54,例如由SEQ ID NO:54组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:55,例如由SEQ ID NO:55组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:56,例如由SEQ ID NO:56组成;

[0587] c)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:4,例如由SEQ ID NO:4组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:5,例如由SEQ ID NO:5组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:6,例如由SEQ ID NO:6组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:17,例如由SEQ ID NO:17组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:18,例如由SEQ ID NO:18组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:78,例如由SEQ ID NO:78组成;或

[0588] d)重链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:84,例如由SEQ ID NO:84组成;重链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:85,例如由SEQ ID NO:85组成;重链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:86,例如由SEQ ID NO:86组成;轻链可变区CDR1,其包含SEQ ID NO:97,例如由SEQ ID NO:97组成;轻链可变区CDR2,其包含SEQ ID NO:98,例如由SEQ ID NO:98组成;以及轻链可变区CDR3,其包含SEQ ID NO:99,例如由SEQ ID NO:99组成。

[0589] 48.如实施例1至47中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

[0590] a)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:13,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:24,例如由其组成;或

[0591] b)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:50,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:61,例如由其组成;或

[0592] c)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:24具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

[0593] d)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:50具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:61具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

[0594] e)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:24差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;或

[0595] f)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:50差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:61差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;

[0596] g)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:13,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:80,例如

由其组成;或

[0597] h)VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:93,例如由其组成,该VL包含SEQ ID NO:104,例如由其组成;或

[0598] i)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:80具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

[0599] j)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:93具有至少95%同源性的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:104具有至少95%同源性的序列,例如由其组成;或

[0600] k)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:13差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:80差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成;或

[0601] l)VH和VL,该VH包含与SEQ ID NO:93差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成,该VL包含与SEQ ID NO:104差异至少1、2、3、4、5、6个氨基酸的序列,例如由其组成。

[0602] 49.如实施例1至48中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

[0603] a)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、或SEQ ID NO:39,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0604] b)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、或SEQ ID NO:76,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0605] c)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:39具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:26具有至少95%序列同一性;

[0606] d)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:76具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有至少95%序列同一性;

[0607] e)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:82,例如由其组成;

[0608] f)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列包含SEQ ID NO:95,例如由其组成,该轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:106,例如由其组成;

[0609] g)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:15具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:82具有至少95%序列同一性;或

[0610] h)重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列,该重链氨基酸序列与SEQ ID NO:95具有至少95%序列同一性,该轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:106具有至少95%序列同一性。

[0611] 50.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与人髓系细胞触发受体2(hTREM2)的免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域结合,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0612] a)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0613] b)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:29,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0614] c)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:33,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0615] d)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:35,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0616] e)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:37,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0617] f)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:39,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:26,例如由其组成;

[0618] g)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:52,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0619] h)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:66,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0620] i)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:70,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0621] j)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:72,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0622] k)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:74,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0623] l)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:76,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:63,例如由其组成;

[0624] m)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:15,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:82,例如由其组成;或

[0625] n)重链序列和轻链序列,该重链序列包含SEQ ID NO:95,例如由其组成,该轻链序列包含SEQ ID NO:106,例如由其组成。

[0626] 51.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与如实施例1-50中任一项所述的任何抗体或其抗原结合片段竞争结合hTREM2蛋白。

[0627] 52.一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段结合与如实施例1-51中任一项所述的任何抗体或其抗原结合片段的表位重叠的表位。

[0628] 53.如实施例1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0629] 54.如实施例1-52中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含选自以下的Fc区:IgG1 Fc区、IgG2 Fc区、IgG4 Fc区、或IgG2/IgG4杂合Fc区。

[0630] 55.如实施例1-49或51-54中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含修饰的Fc区,该修饰的Fc区与亲本抗体相比具有降低的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。

[0631] 56.如实施例1-55中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段是人或人源化抗体或其片段。

[0632] 57.如实施例1-56中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与另一个部分缀合。

[0633] 58.如实施例1-57中任一项所述的抗体,其中所述抗体是IgG1同种型。

[0634] 59.如实施例1-56中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人或人源化抗体。

[0635] 60.如实施例1-57中任一项所述的抗体的抗原结合片段,其中该抗原结合片段选自Fab、F(ab')2、Fv片段、scFv、微抗体或双抗体。

[0636] 61.如实施例1-60中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆的。

[0637] 62.如实施例1-61中任一项所述的抗体,其中该抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0638] 63.如实施例62所述的抗体,其中该多特异性抗体,例如双特异性抗体,特异性结合hTREM2和人DAP12(12kDa的DNAX活化蛋白)。

[0639] 64.如实施例1-63中任一项所述的抗体,其中所述抗体通过Fc区的突变而具有改变的效应子功能。

[0640] 65.一种核酸分子或核酸分子组,该核酸分子或核酸分子组编码如实施例1至64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种。

[0641] 66.如实施例65所述的核酸分子,其中该核酸是DNA。

[0642] 67.如实施例65或66所述的核酸分子或核酸分子组,该核酸分子或核酸分子组包含SEQ ID NO:14、28、51、65、16、30、34、36、38、40、53、67、71、73、75、77、25、31、62、68、27、32、64、69、13、93、15、95、80、104、82或106中的一个或多个。

[0643] 68.一种载体,该载体包含如实施例65-67中任一项所述的核酸分子。

[0644] 69.如实施例68所述的载体,其中该载体是克隆载体或表达载体。

[0645] 70.如实施例68或69所述的载体,其中所述载体包含SEQ ID NO:14、28、51、65、16、30、34、36、38、40、53、67、71、73、75、77、25、31、62、68、27、32、64、69、13、93、15、95、80、104、82或106中的一个或多个,或其编码至少一个CDR区的片段。

[0646] 71.如实施例68-70中任一项所述的载体,其中该载体能够在原核细胞和/或真核细胞中复制。

[0647] 72.如实施例68-71中任一项所述的载体,其中该载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、粘粒或病毒载体。

[0648] 73.如实施例68-72中任一项所述的载体,其还包含可检测标志物和/或选择标志物。

[0649] 74.具有两个如实施例68-73中任一项所述的表达载体的组,一个载体编码a)包含SEQ ID NO:13或50的至少一个VH结构域,并且另一个载体编码包含SEQ ID NO:24或61的至少一个VL结构域;或

[0650] b)包含SEQ ID NO:13或93的至少一个VH结构域,并且另一个载体编码包含SEQ ID NO:80或104的至少一个VL结构域。

[0651] 75.如实施例68-74中任一项所述的载体,其中该载体是病毒载体,任选其中该病毒载体是慢病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、细小病毒、逆转录酶病毒、牛痘病毒、辛德毕斯病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒(NDV)、麻疹病毒、水疱性

口炎病毒(VSV)、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、塞内卡谷病毒、柯萨奇病毒、肠病毒、粘液瘤病毒或马拉巴病毒。

[0652] 76.如实施例75所述的载体,其中该载体是AAV载体。

[0653] 77.如实施例68-76中任一项所述的载体,其中该载体还包含启动子。

[0654] 78.如实施例68-77中任一项所述的载体,其中该载体包含AAV9衣壳和AAV载体质粒,该AAV载体质粒包含(1)衍生自AAV2的ITR,(2)CMV增强子(例如,包含SEQ ID NO:134),(3)CBA启动子(例如,包含SEQ ID NO:135),(4)SV40内含子(例如,包含SEQ ID NO:137),(5)编码hTREM2抗体或其抗原结合片段(例如,如本文所述)的多核苷酸,和(6)BGH聚A信号(例如,包含SEQ ID NO:138)。

[0655] 79.如实施例78所述的载体,元件(2)至(6)从5'至3'布置在该AAV载体质粒上。

[0656] 80.如实施例78或79所述的载体,其中元件(2)至(6)中的任一个布置在该AAV载体质粒上的5'ITR和3'ITR之间。

[0657] 81.如实施例78-80中任一项所述的载体,其中该AAV载体是scAAV载体。

[0658] 82.如实施例68-75中任一项所述的载体,其中该载体是慢病毒载体。

[0659] 83.一种细胞,其包含如实施例64-66中任一项所述的核酸分子或核酸分子组或如实施例68-82中任一项所述的载体。

[0660] 84.一种产生hTREM2抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括:(i)培养如实施例83所述的细胞和(ii)从培养物中分离该hTREM2抗体或其抗原结合片段。

[0661] 85.一种药物组合物,其包含如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体或如实施例83所述的细胞,和药学上可接受的载体。

[0662] 86.如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物,其用作药物。

[0663] 87.如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物,其用于治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病。

[0664] 88.如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物用于制备用于治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病的药物的用途。

[0665] 89.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该疾病是神经炎症或神经退行性疾病,任选地,其中该神经炎症或神经退行性疾病是阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)、黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑

炎(Rasmussen's encephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。

[0666] 90.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该疾病是阿尔茨海默病。

[0667] 91.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该疾病是帕金森病。

[0668] 92.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该疾病是多发性硬化。

[0669] 93.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该疾病是额颞叶痴呆。

[0670] 94.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用受试者。

[0671] 95.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物与至少一种另外的治疗剂或程序组合地施用受试者。

[0672] 96.如实施例87所述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或核酸分子组、载体、细胞或药物组合物,或如实施例88所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物与至少一种另外的治疗剂组合地施用受试者,其中所述治疗剂包含以下中的一种或多种:BACE抑制剂、抗Tau抗体、Tau反义寡核苷酸、抗淀粉样β抗体、芬戈莫德、BG12或富马酸二甲酯、干扰素β或那他珠单抗。

[0673] 97.一种在有需要的受试者中治疗与hTREM2功能丧失相关的疾病的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物。

[0674] 98.如实施例97所述的方法,其中该方法包括:

[0675] a)测定从受试者获得的样品中的细胞表面hTREM2水平;

[0676] b)选择细胞表面hTREM2水平低于参考水平的受试者,其中该参考水平是从健康受试者获得的样品中的细胞表面hTREM2水平;以及

[0677] c)向所选受试者施用治疗有效量的如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物。

[0678] 99.如实施例98所述的方法,其中该样品包含脑脊液。

[0679] 100.如实施例98或99所述的方法,其中所述样品中的细胞表面TREM2水平通过选自以下的测定来确定:流式细胞术、免疫组织化学、蛋白质印迹、免疫荧光测定、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、均相时间分辨荧光(HTRF)、或正电子发射断层扫描(PET)。

[0680] 101.如实施例97-100中任一项所述的方法,其中与TREM2功能丧失相关的疾病是神经炎症或神经退行性疾病,任选地,其中该神经炎症或神经退行性疾病是阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、那须-哈科拉病、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化(ALS)、抗NMDA受体脑炎、自闭症、脑狼疮(NP-SLE)、化疗引起的周围神经病变(CIPN)、带状疱疹后神经痛、慢性炎症性脱髓磷脂性多发性神经病(CIDP)、癫痫、格林-巴利综合征(GBS)、包涵体肌炎、溶酶体贮积病、尼曼-皮克病(Niemann-Pick C)、黏多糖病II/IIIB、异染性脑白质营养不良、多灶性运动神经病、重症肌无力、神经白塞病、视神经脊髓炎(NMO)、视神经炎、多肌炎、皮肌炎、拉斯穆森脑炎(Rasmussen'sencephalitis)、雷特综合征、中风、横贯性脊髓炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、病毒性脑炎或细菌性脑膜炎。

[0681] 102.如实施例97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是阿尔茨海默病。

[0682] 103.如实施例97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是帕金森病。

[0683] 104.如实施例97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是多发性硬化。

[0684] 105.如实施例97-101中任一项所述的方法,其中该疾病是额颞叶痴呆。

[0685] 106.如实施例97-105中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物通过口服、静脉内、颅内、鞘内、皮下或鼻内途径施用该受试者。

[0686] 107.一种稳定受试者中的hTREM2蛋白的方法,该方法包括以有效稳定hTREM2的量向该受试者施用如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物。

[0687] 108.如实施例97-107中任一项所述的方法,该方法还包括向该受试者施用至少一种另外的治疗剂或进行至少一种另外的治疗程序。

[0688] 109.如实施例108所述的方法,其中所述另外的治疗剂包含以下中的一种或多种:BACE抑制剂、抗Tau抗体、Tau反义寡核苷酸、抗淀粉样β抗体、芬戈莫德、BG12或富马酸二甲酯、干扰素β或那他珠单抗。

[0689] 110.如实施例108或109所述的方法,其中如实施例1-64中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如实施例65-67中任一项所述的核酸分子或核酸分子组、如实施例68-82中任一项所述的载体、如实施例83所述的细胞或如实施例85所述的药物组合物与该另外的治疗剂同时、在该另外的治疗剂之前或在该另外的治疗剂之后施用。

[0690] 111.如实施例97-110中任一项所述的方法,其中施用该抗体或其抗原结合片段、该核酸分子或核酸分子组、该载体、该细胞或该药物组合物具有以下效果a-d中的一种或多种:

[0691] a)增加TREM2依赖性细胞活性,如吞噬作用和趋化性,

[0692] b)触发TREM2依赖性基因转录,

[0693] c)增加经由Syk-磷酸化的TREM2依赖性细胞内信号传导途径,

[0694] d)增加细胞碎片的清除。

[0695] 实例

[0696] 在以下实例中进一步描述了本发明,这些实例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0697] 实例1:产生人TREM2的抗体

[0698] 材料和方法

[0699] 试剂

[0700] 为了选择识别人、小鼠和食蟹猴TREM2的抗体,采用多种淘选策略。使用基于HuCAL®的噬菌粒文库HuCAL PLATINUM®,通过选择具有高结合亲和力的克隆产生针对TREM2蛋白的抗体(Prassler等人2011;Rothe等人2008;Knappik等人2000)。MorphoSys噬菌体展示文库使用CysDisplay™技术在噬菌体表面上展示Fab(WO 01/05950)。为了分离抗TREM2抗体,使用固相、溶液,全细胞和差异全细胞淘选方法进行标准以及RapMAT成熟淘选策略。

[0701] 初始淘选

[0702] 为了接收针对抗原TREM2溶液结合的初始候选物,进行Fc捕获淘选和差异全细胞淘选。

[0703] 表2.初始和备用淘选策略和应用的抗原浓度。

[0704]

淘选策略	淘选模式	抗原第一轮	抗原第二轮	抗原第三轮
1	溶液	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (100 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (20 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (4 nM)
2	Fc 捕获	hTREM2 ECD (19-174)-hFc (2 μg/ml) *预清除 hTREM2 IgSF-hTREM1 茎-hFc (2 μg/ml)*	hTREM1 IgSF-hTREM2 茎 -hFc (2 μg/ml) *预清除 hTREM2 IgSF-hTREM1 茎 -hFc (2 μg/ml)*	hTREM1 IgSF-hTREM2 茎-hFc (0.4 μg/ml) *预清除 hTREM2 IgSF-hTREM1 茎-hFc (2 μg/ml)*
3	dWCP	CHO-hDAP12-hTREM2 *(NVP-10-17 处理的) 吸附后 CHO-hDAP12 预清除 hTREM2-IgSF-hFc*	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (100 nM) *封闭 hTREM2-IgSF-hFc (500 nM)*	CHO-hDAP12-cyTREM2 *(NVP-10-17 处理的)*

[0705] Fc捕获淘选

[0706] 在抗原选择过程之前,为了确定最佳抗原包被浓度,必须进行包被检查ELISA。对于捕获淘选,将抗原(hTREM1 IgSF-hTREM2茎-hFc、hTREM2 ECD(19-174)-hFc或hTREM2 ECD-His)通过合适的捕获抗体固定在96孔板上,所述捕获抗体取决于融合至相应的抗原的标签(对于Fc标签化的抗原,山羊和小鼠抗人Fc,详见表2)。

[0707] 孔的数量取决于所使用的子文库池的数量。与孔制备平行,用含有0.05%吐温-20的Chemiblocker封闭噬菌体;将另外的封闭试剂加入封闭缓冲液中以避免选择针对标签或捕获抗体(对于Fc捕获淘选,人、山羊和小鼠γ球蛋白)的抗体的选择。为了预先清除封闭的噬菌体,用hTREM2-IgSF-hTREM1茎-hFc包被96孔板的适当数量的孔。添加噬菌体并在室温下孵育30分钟。将上清液转移到另一个反靶标包被的孔中并重复孵育三次。在封闭和预清除程序后,将噬菌体混合物加入到对应的抗原包被的孔中,并使噬菌体-抗体在室温下与抗

原结合1.5小时。使用PBS/吐温20和PBS洗涤确保去除非特异性结合的噬菌体,然后使用DTT洗脱特异性结合的噬菌体。将洗脱物转移到大肠杆菌TG1培养物中用于噬菌体感染。在37℃孵育45分钟后,将培养物离心,将细菌沉淀重新悬浮在新鲜培养基中并铺在琼脂板上。在生长后,将菌落从板上刮下并用于如下所述的噬菌体拯救、所选克隆的多克隆扩增和噬菌体生产。用经纯化的噬菌体开始下一轮淘选。

[0708] 根据第一轮淘选的方案进行第二轮和第三轮捕获淘选。抗原量减少,并且应用具有增加的严格性的洗涤条件。

[0709] 亲本结合物MOR041874衍生自该淘选策略。

[0710] 用链霉亲和素偶联的磁珠进行溶液淘选

[0711] 溶液淘选的先决条件是抗原的生物素化和生物素化抗原的保留活性的确认。在溶液淘选期间,展示Fab的噬菌体和生物素化的抗原在溶液中孵育,这有利于噬菌体接近抗原。

[0712] 用Chemiblocker封闭适量的链霉亲和素珠。平行地,用含有0.05%吐温-20和人γ球蛋白#1(0.05mg/ml)的Chemiblocker封闭适量的噬菌体,以避免结合hFc的克隆的选择。为了去除链霉亲和素或珠结合噬菌体,使用经封闭的链霉亲和素珠进行经封闭的噬菌体颗粒的预吸附。因此,将生物素化的TREM2添加到预吸附的和经封闭的噬菌体颗粒中,并允许噬菌体-抗体在溶液中在室温下结合抗原1小时。使用封闭链霉亲和素珠捕获噬菌体-抗原复合物,并且用磁性分离器收集与链霉亲和素珠结合的噬菌体颗粒。在若干个洗涤步骤中洗掉非特异性结合的噬菌体。通过添加DTT从链霉亲和素珠上洗脱特异性结合的噬菌体。将洗脱物转移到大肠杆菌TG1培养物中用于噬菌体感染。在37℃孵育45分钟后,将培养物离心,将细菌沉淀重新悬浮在新鲜培养基中并铺在琼脂板上。在生长后,将菌落从板上刮下并用于如下所述的噬菌体拯救、所选克隆的多克隆扩增和噬菌体生产。用经纯化的噬菌体开始下一轮淘选。

[0713] 根据第一轮淘选的方案进行第二轮和第三轮的基于珠的溶液淘选。应用具有增加的严格性的洗涤条件。亲本结合物MOR042492、MOR042493和MOR042556衍生自该淘选策略。

[0714] 差异全细胞淘选(dWCP)

[0715] 在淘选前一天将细胞用5μM DPC333预处理过夜(Qian等人2007.Drug Metab and Disp[药物代谢和处置]35:1916-1925)以增加TREM2的表面表达。对于每次淘选,将适量的噬菌体用洗涤缓冲液(DPBS+/5%FCS/0.02% NaN_3)封闭,并根据上述用于Fc捕获淘选的方法预清除。平行地,用洗涤缓冲液封闭每个噬菌体池的适当量的表达抗原TREM2(1×10^7细胞/子代码)的靶细胞和适当量的不表达抗原TREM2的吸附细胞。将封闭的靶细胞离心,重悬浮于预封闭的噬菌体颗粒中,并且使噬菌体-抗体与细胞上存在的抗原在4℃下结合2小时,以避免受体内化。将噬菌体-细胞复合物洗涤若干次。通过离心细胞并将沉淀重悬于50mM柠檬酸盐缓冲液pH 3.5/150mM NaCl中并在室温下孵育10分钟,从靶细胞洗脱特异性结合的噬菌体。离心后,将上清液(洗脱液)用2M Tris碱中和并施加到吸附细胞上以除去与靶抗原以外的细胞表面分子结合的噬菌体(吸附后)。使用DTT从靶细胞洗脱特异性结合的噬菌体,并将最终上清液转移至大肠杆菌TG1培养物用于如上所述的噬菌体感染。

[0716] 根据上述溶液淘选进行第二轮淘选。根据第一轮淘选轮次的方案进行第三轮全细胞淘选。

[0717] 亲本结合物MOR042596、MOR042752和MOR042765衍生自该淘选策略。

[0718] 呈递Fab的噬菌体颗粒的产生

[0719] 对于每轮选择,产生在其表面上呈递Fab片段的新噬菌体颗粒。对于每种噬菌体制剂,将12ml 2x YT/Cam/Glc培养基用来自相应的文库甘油储备液的细菌接种,导致OD600为0.1-0.2。将培养物在120rpm和37℃下振荡30-90分钟直至OD600达到0.45-0.55。然后,以感染复数为10将辅助噬菌体添加至细菌培养物中,随后在37℃不伴随振荡孵育30分钟,并然后在37℃以160rpm伴随振荡30分钟。将细菌旋转沉降,并丢弃含有辅助噬菌体的上清液。将噬菌体感染的细菌重悬浮于400ml2x YT/Cam/Kan/IPTG培养基中,并在22℃以120rpm伴随振荡孵育过夜。第二天,将来自过夜培养物的细菌沉淀,并收集含有呈递Fab的噬菌体的上清液。通过将1/5总体积的预冷却的PEG/NaCl添加至含有噬菌体的上清液中来进行噬菌体沉淀。将样品在冰上孵育至少30分钟直到沉淀性噬菌体的云状物变得可见。将沉淀的噬菌体旋转沉降并重悬浮于PBS中。通过斑点滴定法测定噬菌体滴度。

[0720] 亲和力成熟前去除PTM

[0721] 由于亲本候选物MOR042492在其HCDR3中包括关键的翻译后修饰(PTM),因此在进入亲和力测定之前修复该候选物。因此,通过寡核苷酸交换产生三种修复的变体,而通过测序确认成功进行的寡核苷酸交换。将作为含有Fab的粗细菌裂解物的修复的变体对hTREM2-ECD(19-174)-hFc进行测试。将表现相似结合谱的变体池化用于亲和力成熟(MOR043962和MOR043963)。

[0722] 生成HuCAL PLATINUM®成熟文库和HuCAL PLATINUM®RapMAT文库

[0723] 为增加所选抗体的亲和力和生物活性,使用三核苷酸定向诱变通过盒诱变优化CDR-L3和CDR-H2区,同时框架区保持恒定(Virnekäs等人(1994)Nucleic Acids Res[核酸研究]22,第5600-5607页)。

[0724] 在编码亲本Fab片段的CysDisplay™载体中进行成熟文库的克隆。如果尚未存在于CysDisplay™载体中,则在文库克隆之前,通过限制性消化和连接将编码亲本Fab片段的DNA序列转移到对应的载体中。

[0725] 针对每个成熟候选物中单独地进行HuCAL PLATINUM®成熟文库的产生,或者在产生文库之前将具有不同的亲本抗体的组进行池化。针对CDR-L3优化,通过限制酶切消化将编码CDR-L3、框架4以及轻链恒定区的约400bp DNA片段才编码亲本抗体的序列中去除,并且被编码多样化的CDR-L3区连同框架4和恒定结构域的DNA片段储库替换。

[0726] 在第二个文库集中,CDR-H2编码序列是多样化的,而连接框架区保持恒定。为减少亲本非多样化序列的背景,通过限制酶切消化和连接,将含有亲本CDR-H2和框架3序列的约150bp DNA片段替换为约590bp的虚拟序列,然后还通过限制酶切消化和连接插入多样化的CDR-H2盒(包括框架3)。该方法用于所有成熟候选物,MOR042556除外。

[0727] 对选择的克隆(亲本候选物MOR042556)进行HuCAL PLATINUM®RapMAT文库的生成。因此,将包含从phoA信号到框架3(包括H-CDR1和CDR-H2)的DNA序列的月370bp DNA片段通过限制性消化除去,并用编码多样化CDR-H2区和非多样化框架特异性CDR-H1的DNA片段的储库取代。连接混合物在MC1061F'细胞中的电穿孔产生大约10^8至10^9个(以>$5x10^6$)独立的菌落。如前所述(Rauchenberger等人2003)进行文库的扩增。针对质量控制,随机挑选每个文库中大约10-20个单一菌落并测序。

[0728] 成熟淘选

[0729] 为了增加先前选择的抗体片段的亲和力和生物活性,如上所述,通过多样化的盒/模块(Prassler等人,2009)平行交换CDR-L3和CDR-H2区域。如果需要,在文库克隆用于亲和力成熟之前,将亲本Fab片段从相应的表达载体转移到CysDisplay™载体中。

[0730] 为了选择亲和力改善的候选物,将衍生自成熟文库的噬菌体进行三轮成熟淘选。如上所述并根据表3中所述的条件进行溶液淘选和dWCP。

[0731] 表3:成熟淘选策略和应用的抗原浓度。

淘选策略	淘选模式	包含亲本	成熟文库	抗原第一轮	抗原第二轮	抗原第三轮
4	溶液	MOR043962 MOR043963	HCDR2	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.5 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.1 nM)
5	溶液	MOR042493	HCDR2 LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.5 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.1 nM)
6	溶液	MOR042493	LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (5 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2.5 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.75 nM)
7	溶液	MOR042596	HCDR2 LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (1 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.2 nM)
8	溶液	MOR042752	HCDR2	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (1 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.2 nM)
9	溶液	MOR042765	HCDR2	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (5 nM)	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2.5 nM)	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.75 nM)
10	dWCP	MOR043962	HCDR2/LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	CHO-hDAP12-cyTREM2 *(没有NVP-10-17)*	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.1 nM)
11	dWCP	MOR042556	HCDR1_2/LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	CHO-hDAP12-cyTREM2 *(没有NVP-10-17)*	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.1 nM)
12	dWCP	MOR042596	HCDR2/LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	CHO-hDAP12-cyTREM2 *(没有NVP-10-17)*	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.2 nM)
13	dWCP	MOR041874	HCDR2/LCDR3	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (5 nM)	CHO-hDAP12-cyTREM2 *(没有NVP-10-17)*	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.5 nM)
14	dWCP	MOR042556	HCDR1_2/LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (2 nM)	BV2 *(NVP-10-17 处理的)*	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.2 nM)
15	dWCP	MOR042765	HCDR2/LCDR3	hTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (5 nM)	BV2 *(NVP-10-17 处理的)*	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc-bio (0.5 nM)
						使用未生物素化的抗原(100x摩尔过量)进行 K_{off} 选择

[0732]

[0733] 通过降低每轮淘选中的抗原浓度来提高淘选的严格性(Low等人1996)。除抗原减少外,还在第三轮淘选中进行了解离速率选择(Hawkins等人1992):将抗原-噬菌体复合物与过量的未生物素化的TREM2抗原一起孵育,以仅富集高亲和力结合物;弱结合物预期优先结合溶液中的过量抗原,并且因此可以除去。这与大量洗涤步骤相结合。用DTT进行从与磁珠偶联的TREM2洗脱高亲和力噬菌体。

[0734] 针对大肠杆菌从展示载体亚克隆到Fab-表达载体中

[0735] 为了促进可溶性Fab在大肠杆菌中的快速表达,将选择的HuCAL PLATINUM®噬菌体的编码Fab的插入物从pMORPH®30展示载体亚克隆到Fab表达载体pMORPH®x11_Fab-FH中。通过EcoRI|XbaI|BmtI进行三重消化进行亚克隆。

[0736] 亚克隆到针对HKB11细胞的IgG和FabCys表达载体中

[0737] 对于HKB11细胞中的全长IgG或单价FabCys表达,将选择的候选物或候选物池克隆到对应的包含所需的特征/标签的表达载体中。表4中描述了IgG和FabCys形式以及对应的可获得的载体的概述。

[0738] 按两步法进行亚克隆,以便方便且有效地将大量序列特异性Fab克隆转化为IgG形式。

[0739] 表4.HuCALPLATINUM®pMorph4 IgG和FabCys表达载体系列

[0740]

载体名称	形式	标签	
pM4_h_FabCys	人 FabCys	N/A	
pM4_h_FabCys-AviH	人 FabCys	Avi 标签	His6
pM4_h_IgG1f_LALA	人 IgG	N/A	
pM4_h/m_IgG2a	嵌合 IgG	N/A	

[0741] 从HuCAL PLATINUM® RapCLONE®进行亚克隆

[0742] 在第一克隆步骤中,将真核表达盒通过BsiWI|MfeI(用于κ池)或HpaI|MfeI(用于λ池)消化和随后的连接引入展示载体或用于在大肠杆菌中Fab表达的载体。然后进行第二克隆步骤,其中将含有表达盒的Fab池用EcoRV|BlpI(κ和λ池)消化,并且随后克隆到受体载体中以在哺乳动物细胞中表达。

[0743] 在大肠杆菌中产生

[0744] 含有粗制细菌裂解物的Fab的产生

[0745] 对用生长培养基(含有氯霉素、IPTG和低葡萄糖的2xYT)预先填充的96孔/384孔微量滴定板进行接种。将板在37℃孵育以进行细菌生长,并在22℃下振荡过夜以进行Fab表达。第二天,通过添加含有硼酸盐缓冲液、EDTA和溶菌酶的BEL缓冲液裂解表达培养物。如果裂解物用于敏感细胞筛选,则省略EDTA。

[0746] His标签化的Fab片段的探索性规模产生

[0747] 在摇瓶培养物(使用500mL的2xYT培养基,其中补充0.1%葡萄糖和34μg/mL氯霉素)中进行细菌表达载体编码的Fab片段在大肠杆菌TG1 F细胞中的表达。振荡培养物直至OD600达到0.5的值。通过添加IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)并进一步培养20小时诱导Fab表达。收获细胞并使用溶菌酶破坏。通过IMAC(伯乐公司(Bio-Rad))并使用咪唑洗脱来分离His6标签化的Fab片段。使用'PD10'柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare))进行缓冲液交换到1x杜氏PBS(Dulbecco′sPBS)(pH 7.2)。将样品无菌过滤(0.2μm)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的IgG制剂。

[0748] 在HKB11细胞中IgG的产生

[0749] IgG的进阶微量产生

[0750] 用编码IgG的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。转染后7天收获细胞培养物上清液,并进行蛋白A亲和色谱(MabSelect SURE™,通用电气医疗集团)。样品保留在中和的洗脱缓冲液(NaPS:137mM磷酸钠,81mM NaCl,pH 7)中。将样品无菌过滤(0.2μm)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII™,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的IgG制剂。

[0751] IgG的探索性规模产生

[0752] 用编码IgG的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。在转染后第3或6天收获细胞培养物上清液,并进行标准蛋白A亲和色谱(MabSelect SURE,通用电气医疗集团)。将缓冲液交换到1x杜氏PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的IgG制剂。

[0753] 用于体内表征的材料产生

[0754] 用编码IgG的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。在转染后第6天收获细胞培养物上清液,并进行蛋白A亲和色谱(MabSelect SURE,通用电气医疗集团)。如果需要,进行第二纯化步骤(制备型SEC,Superdex 200,通用电气医疗集团)以除去聚集体。将缓冲液交换到1x杜氏PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析IgG的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的IgG制剂。通过KQCL测定(龙沙集团(Lonza))确定内毒素水平。使用质谱分析确认蛋白质同一性。

[0755] 在HKB11细胞中FabCys的产生

[0756] 无标签FabCys的探索性规模产生

[0757] 用编码二硫键桥连FabCys的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。在转染后第3或7天收获细胞培养物上清液,并进行CH1亲和色谱(Capture Select IgG-CH1,赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))。将缓冲液交换到1x杜氏PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm孔径)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析FabCys的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的FabCys制剂。

[0758] AviHis标签化的FabCys的探索性规模产生

[0759] 用编码二硫键桥连FabCysAviHis的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。在转染后第3或7天收获细胞培养物上清液,并进行金属离子亲和色谱(Protino Ni-NTA,Macherey Nagel公司)。将缓冲液交换到1x杜氏PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm孔径)。

[0760] 通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析FabCysAviHis的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的FabCysAviHis制剂。

[0761] 总结淘选策略

[0762] 初始和备用淘选策略旨在选择针对TREM2的细胞外结构域IgSF结构域和茎区两者的抗体。因此,包括对于完整TREM2 ECD的策略以及用于选择茎区域以及甚至脱落酶切割位点特异性克隆的更具体策略。对于每个靶向的TREM2结构域特异性,应用了3种不同的抗原呈递模式:使用生物素化抗原进行溶液淘选,Fc捕获淘选和差异全细胞淘选,在第一和第三轮淘选中用表达抗原的细胞并且在第二轮淘选中用重组抗原。茎区特异性可以通过使用开关构建体(switch construct)来实现,该开关构建体由TREM1 IgSF结构域与TREM2茎区组合或反之亦然组成,用作淘选抗原(hTREM1 IgSF-hTREM2茎)或用于封闭(hTREM2IgSF-hTREM1茎)来实现。基于作图实验,脱落酶切割位点区域包含TREM2茎区的近膜部分中20个氨基酸;相应的肽78用于富集切割位点特异性克隆。

[0763] 可以鉴定针对所有靶向的TREM2 ECD区域的抗体。然而,仅选择具有最有希望的稳定活性谱(即茎区特异性,连同食蟹猴交叉反应性和细胞结合)的小数目的克隆。

[0764] 总结筛选结果

[0765] 初步筛选

[0766] 使用Intellicyt装置(每个子代码368个克隆),在多重方法中,将初始淘选的所有子代码关于生物素化的hTREM2、mTREM2、hTREM1IgSF-hTREM2茎、hTREM2 IgSF-hTREM1茎和hTREM1进行筛选。总共筛选了来自初始淘选的9200个克隆,并导致选择736个初步命中。大多数IgSF结构域特异性克隆源自对hTREM2的溶液淘选,而大多数茎区特异性抗体来自差异全细胞淘选。

[0767] 以与初始淘选类似的方式筛选备用淘选。平行地,将涉及一轮或多轮细胞淘选的所有子代码关于亲本CHO-DAP12以及CHO-DAP12-hTREM2细胞进行筛选。此外-取决于细胞淘选中使用的细胞类型-将一些子代码关于CHO-DAP12-cyTREM2、CHO-DAP12-mTREM2、CHO-DAP12-hTREM1 IgSF-hTREM2茎、HEK-DAP12-hTREM2融合和THP1-NFAT-luc细胞进行另外的筛选。总共筛选了10304个克隆并导致选择402个初步命中。

[0768] 二次筛选和多样性确定

[0769] 基于初始淘选的736个初次命中的二次筛选(与hu/cy/mu TREM2结合(使用不同重组蛋白和细胞系),结构域特异性(使用TREM2/TREM1开关构建体和切割位点肽78),TREM1反筛选),选择284个克隆用于VH测序。其中,104个克隆具有独特的HCDR3序列。类似地,来自备用淘选的402个初步命中经受二次筛选和所选克隆的VH测序,产生186个新的HDR3独特克隆。从初始活动中仅鉴定出5个已知的序列。

[0770] 确认和进一步表征独特的克隆

[0771] 通过进一步的验证性筛选测定,将来自初始活动的81/104个独特克隆和来自备用活动的165/186个独特克隆定义为hTREM2特异性抗体克隆并选择用于随后的功能表征(总共246个克隆)。根据它们的结合行为,这些克隆可以分成不同的谱组。大多数克隆是IgSF结构域特异性的(173个克隆,70%)。这些克隆中的大多数特异性结合过表达TREM2的细胞,并且与食蟹猴TREM2交叉反应(157个克隆)。此外,鉴定了53种(22%)茎区特异性抗体。19/53克隆不与切割位点肽78结合,因此称为“茎(外切割位点)”抗体;这些克隆中的14个显示TREM2特异性细胞结合。34/53克隆在TREM2的切割位点区域内结合TREM2(“茎(切割位点)”抗体)。剩余的20个克隆(8%)与TREM2-ECD结合,但与两个开关构建体均不结合,因此被指定为结合“ECD内不明结构域”的抗体;10/20克隆的确特异性结合过表达TREM2的细胞。

[0772] 成熟候选物的选择

[0773] 成熟候选物的选择主要基于鉴定的抗体的功能特征。由于TREM2属于先天免疫受体家族,因此已知其与LPS和其他细菌表面蛋白相互作用。因此,必须从细菌平台切换到哺乳动物平台来产生抗TREM2抗体,以产生适合相关功能测定的材料。

[0774] IgG表征

[0775] 除了结合特征(结构域特异性、物种交叉反应、特异性细胞结合、反靶标结合、亲和力、表位分箱)之外,还研究了不同功能方面(不同细胞系统中TREM2细胞表面水平的稳定化、NFAT RGA中的信号活化、内化、与配体结合的竞争、吞噬作用)。

[0776] 只有少数抗体证明具有稳定TREM2的作用,即防止TREM2胞外域脱落。考虑到所有其他标准,确定了五种有希望的稳定TREM2的抗体:MOR042492、MOR042493和MOR042589、MOR042596、MOR042556。

[0777] 除稳定性候选物外,还可鉴定活化TREM2信号的抗体。再次考虑其他相关标准,最感兴趣的候选物是MOR041874、MOR042785、MOR042752、MOR042765。

[0778] 这五种候选物如表5所示。

[0779] 表5.成熟候选物。

[0780]

MOR#		42492	42493	42556	42589	42596	41874	42752	42765	42785
类型		稳定性抗体					活化性抗体			
框架		VH1A κ1	VH6 κ1	VH6 κ1	VH3-23 κ1	VH1B κ1	VH1B λ1	VH1A κ1	VH5 λ2	VH1B λ1
结构域		IgSF	IgSF	IgSF	IgSF	IgSF	茎	IgSF	IgSF	茎
淘选策略		溶液,hu ECD	溶液,hu ECD	溶液,hu ECD	dWCP,NGS,溶液 hu 茎	dWCP,NGS,hu/cy ECD,细胞结合	Fc 捕获,hu 茎	dWCP,NGS,hu/cy ECD,细胞结合	dWCP,NGS,hu/cy ECD,细胞结合	dWCP,NGS,溶液 hu 茎
sDAS 风险		培养基	低	培养基	低	低	低	培养基	低	培养基
Biacore K_D[nM]	人	0.2	0.1	0.2	43	12	23	5.1	31	7.2
	食蟹猴	0.2	0.1	< 0.1	100*	6.6	轻微的非特异性结合***	9.1	67*	117 *(稳态 KD)
	小鼠	1	17*	0.2	100**	0.9	轻微的非特异性结合***	72*	160**	86 *(稳态 KD)
交叉反应	食蟹猴	+	+	+	+	+	弱	+	+	弱
	小鼠	+	+	+	弱	+	弱	弱	+	弱
表位		A	A	n.d.	A	A	B	n.d.	A	n.d.
内化(相比于对照的倍数)		16	32	72	92	76	n.d.	13	91	65
配体竞争		无	无	无	无	无	n.d.	有	有	n.d.
TREM2 活化(在 RGA 方面的倍数)		1.2	1.4	1.5	1.8	1.6	3.3	2.1	2.4	3.1
稳定 Mph-FACS		+++	+++	n.d.	+	++++	否	+	++	n.d.
吞噬作用增强		+++	+++	+++	+++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[0781]

[0782] *异源结合;**弱结合,快速解离;***无特异性结合,最高可达300nMPTM去除

[0783] 由于9个成熟候选物中的两个(MOR042492,MOR042589)在其HCDR3中包括翻译后修饰(PTM),所以在亲和力成熟之前修复这些克隆。因此,通过寡核苷酸交换产生三种修复的变体/成熟候选物,而通过测序确认成功进行的寡核苷酸交换。通过BEL筛选进一步测试修

复的变体的功能性。将表现相似结合谱的变体池化用于亲和力成熟。亲本MOR042589另外用于亲和力成熟,因为变体显示出比其亲本克隆更低的结合。

[0784] 亲和力成熟文库的生成

[0785] 最后,由六种前导候选物构成的九个成熟文库(见表6)分开地进入成熟。选择还包括具有最多三种克隆的三个池。那些是具有靶向相同表位的相同框架的克隆或通过PTM去除衍生自一个亲本克隆的子克隆。

[0786] 表6.选择的成熟候选物和文库组成。

[0787]

文库		亲本抗体	去除 PTM 后的子抗体	谱
#1	池 1	*MOR042492*	MOR043962 MOR043963	IgSF; 稳定性
#2	前导 1	MOR042493		IgSF; 稳定性
#3	前导 2	MOR042556		IgSF; 稳定性
#4	池 2	*MOR042589*	MOR043959 MOR043960 MOR043961	IgSF; 稳定性
#5	前导 3	MOR042589		IgSF; 稳定性
#6	前导 4	MOR042596		IgSF; 稳定性
#7	前导 5	MOR042752		IgSF; 活化性

[0788]

#8	前导 6	MOR042765		IgSF; 活化性
#9	池 3	MOR041874 MOR042785		IgSF; 活化性

[0789] 总结成熟淘选

[0790] 由于大多数成熟候选物衍生自初始淘选期间的溶液或差异全细胞淘选,主要是在高严格性下进行溶液淘选以及细胞淘选以鉴定文库生成后改善的结合物。因此,溶液淘选是最初淘选中最成功的策略,分别地使用每个克隆的每个VH和VL文库经三轮进行。另外,将来自第1轮的溶液淘选的淘选输出进行池化。以这种方式,每个淘选文库的VH和VL成熟的子代码以及表现出相似结合谱的克隆的VH和VL文库在它们进入第2轮淘选轮之前进行池化。使这些池进入淘选,该淘选使用无DPC333处理的CHO-DAP12-cyTREM2细胞以降低TREM2水平并且由此增加这些细胞淘选的严格性。这些淘选应确保产生高亲和力细胞结合物,同时进行使用鼠BV2细胞(其应用于多个候选物的池)的淘选以得到hu/m/cy交叉反应性克隆。通过降低抗原浓度以及在第3轮期间通过与溶液中非生物素化的抗原竞争进行k_{off}选择来实现经三轮淘选的严格性增加。另外,根据先前淘选轮的输出,在淘选期间随后调整抗原浓度确保了合适的淘选输出和高亲和力结合物的富集。总之,鉴定了表7中列出的克隆。

[0791] 表7.概述预最终候选物。

[0792]

MOR#	亲本	淘选策略（初始）	淘选策略（成熟）	工程化
MOR044743	MOR041874	2	13	
MOR044693	MOR042493	1	5	
MOR044694	MOR042493	1	6	
MOR044702	MOR042493	1	5	
MOR044746	MOR042493	1	5	
MOR044695	MOR042556	1	14	PTM 去除
MOR044728	MOR042556	1	14	PTM 去除
MOR044734	MOR042556	1	14	PTM 去除
MOR044737	MOR042556	1	14	PTM 去除
MOR044738	MOR042556	1	14	PTM 去除
MOR044739	MOR042556	1	11	PTM 去除
MOR044697	MOR042596	3	12	
MOR044698	MOR042596	3	7	
MOR044705	MOR042596	3	7	
MOR044708	MOR042596	3	12	

[0793]

MOR044713	MOR042752	3	8	
MOR044716	MOR042752	3	8	
MOR044710	MOR042765	3	15	种系化
MOR044717	MOR042765	3	9	种系化
MOR044720	MOR042765	3	9	种系化
MOR044721	MOR043962	1	10	
MOR044722	MOR043962	1	4	
MOR044724	MOR043962	1	10	
MOR044726	MOR043963	1	4	

[0794] 筛选和表征

[0795] ELISA

[0796] ELISA技术用于筛选从靶抗原的淘选输出中鉴定的单个Fab克隆以及用于表征纯化的抗体。

[0797] 抗原的直接包被

[0798] 将抗原固定在微量滴定板上(参见表8)。将板封闭并与抗体如含有Fab的粗制大肠杆菌裂解物或纯化的Fab或IgG样品一起孵育。使用对应的碱性磷酸酶(AP)偶联的二抗与‘AttoPhos’荧光底物组合检测结合的抗体。在各个测定步骤之间进行多个洗涤步骤。

[0799] 表8.用于直接ELISA的抗原和包被。

[0800]

抗原	包被（初始） μg/ml	包被（成熟） μg/ml
hTREM2-ECD (19-174)-hFc	1	N/A
cyTREM2-ECD (19-174)-hFc	5	N/A
mTREM2-ECD (19-171)-mFc	5	N/A
hTREM1 IgSF-hTREM2 茎-hFc	1	N/A
hTREM2 IgSF-hTREM1 茎-hFc	1	N/A
mTREM2-ECD (19-168)-his	3	1
mTREM2-IgSF (19-134)-mFc	5	N/A
hTREM1-hFc-His	1.5	N/A
cyTREM2-ECD (19-174)-APP-Avi	4	N/A

[0801] 抗原捕获ELISA

[0802] 在其他ELISA设置中,抗原(cyTREM2-ECD(19-174)-hFc,1.0μg/ml)通过包被在微量滴定板上的标签特异性抗体(例如抗-Fc)在板上被捕获。使用对应的碱性磷酸酶(AP)偶联的二抗与'AttoPhos'荧光底物组合检测结合的抗体。在各个测定步骤之间进行多个洗涤步骤。

[0803] Fab-表达检查

[0804] 为了验证粗制细菌裂解物中的Fab表达,用Fd-片段特异性抗体包被板。使用对应的碱性磷酸酶(AP)偶联的抗Fab特异性抗体与'AttoPhos'荧光底物组合检测结合的Fab。在各个测定步骤之间进行多个洗涤步骤。

[0805] 通过IntelliCyt的多重化

[0806] 为了同时评估物种交叉反应性和/或不希望的与对等靶标的结合,使用HTFC/iQue筛选平台(IntelliCyt)进行384孔板形式的筛选。

[0807] 在重组蛋白包覆的珠上的筛选

[0808] 将具有不同量的内在荧光的珠与抗原偶联,物理组合成单一悬浮液并与待测抗体一起孵育。通过已经包被的对应珠的荧光鉴定单个抗原。SPHERO链霉亲和素荧光颗粒与生物素化抗原组合使用,并且在预实验中使用工具抗体测试最佳包被密度。将粗制细菌细胞裂解物与抗原包被(参见表9)的和封闭的珠组合,并在室温下在黑暗中轻轻振荡孵育1小时。在随后与荧光标记的二抗孵育后,用IntelliCyt HTFC/iQue装置进行测量。在孵育步骤之间,不需要洗涤。使用"ForeCyt"软件评估原始数据。

[0809] 表9.偶联用于多重筛选的抗原和珠。

[0810]

抗原	偶联(初始) pmol/50μl 珠	偶联(成熟) pmol/50μl 珠
hTREM2-ECD (19-174)-hFc-bio	5	5
cyTREM2-ECD (19-174)-hFc-bio	5	5
hTREM1 IgSF-hTREM2 茎-hFc-bio	5	5
hTREM2 IgSF-hTREM1 茎-hFc-bio	5	5
hTREM2 肽 78-bio	25	
hTREM1-hFc-His-bio		5

[0811] 在重组蛋白包覆的珠上的EC_{50}确定

[0812] 基于珠的测定用于评估纯化的抗体的包括平行地对多种抗原的EC50值。由此,将具有不同量的内在荧光的珠与抗原偶联,物理组合成单一悬浮液并与待测的不同抗体浓度一起孵育。通过已经包被的对应珠的荧光鉴定单个抗原。SPHERO链霉亲和素荧光颗粒与生物素化抗原组合使用(参见表10),并且在预实验中使用工具抗体测试最佳包被密度。在与抗体孵育并且和检测抗体后进行洗涤步骤。

[0813] 表10.偶联用于IgG表征和EC50确定的抗原和珠。

[0814]

抗原	偶联（初始）pmol/50μl 珠	偶联（成熟）pmol/50μl 珠
hTREM2-ECD (19-174)-hFc-bio	5	0.5
cyTREM2-ECD (19-174)-hFc-bio	5	0.5
hTREM1 IgSF-hTREM2 茎-hFc-bio	5	0.5/2
hTREM2 IgSF-hTREM1 茎-hFc-bio	5	0.5
hTREM2 肽 78-bio	25	
hTREM1-hFc-His-bio		5

[0815] FACS

[0816] 使用流式细胞仪,使用来自淘选输出的粗制大肠杆菌裂解物以及不同浓度的纯化抗体鉴定与细胞表面表达抗原的结合事件用于评估EC50值。用于FACS分析的细胞系列于表11中。

[0817] 表11.用于FACS分析的细胞系。

[0818]

细胞系	起源	表面TREM2表达水平
BV2	小鼠	内源性,低表面水平
THP1-dr	人	内源性,低表面水平
THP1-NFAT-luc	人	内源性,低表面水平
THP1-CRISPR/Cas-Trem2-敲除	人	敲除
CHO-hDAP12	人	无
CHO-hDAP12-hTREM2	人	转基因过表达
CHO-hDAP12-cyTREM2	人	转基因过表达
CHO-hDAP12-mTREM2	人	转基因过表达
CHO-hDAP12-hTREM1IgSF-hTREM2茎	人	转基因过表达
HEK293-hDAP12-hTREM2	人	转基因过表达
HEK293亲本	人	无

[0819] 取决于设置,在与抗体孵育之前,用DPC333预处理细胞24小时。所有步骤均在包括FCS和叠氮化物的FACS缓冲液中进行,以防止受体内化。将细胞悬浮液转移至微量滴定板并添加抗体样品,然后在4℃下将板轻轻振荡孵育1小时。孵育后,将细胞离心并用FACS缓冲液洗涤。将荧光团缀合的第二试剂用于检测结合的抗体。使用Intellicyt HTFC/iQue系统测量板,并使用适当的软件分析数据。

[0820] 在细胞上的筛选

[0821] HTFC/iQue筛选系统还用于评估与多个靶细胞系的结合或平行评估不需要/非特异性结合。通过以下来区分不同的细胞群:用不同量的荧光染料(例如钙黄绿素或Cell-Tracker绿)预标记,为每个细胞群建立荧光强度的独特特征=荧光条形码。然后将颜色编码的细胞系物理组合并与待测试的含有Fab的粗制细菌裂解物混合在一起。通过已经预标记的对应细胞系的荧光鉴定各个细胞系。将粗制细菌细胞裂解物与细胞(CHO-hDAP12-hTREM2和CHO-DAP12)组合,并在4℃下在黑暗中轻轻振荡孵育1小时。使用IntelliCyt HTFC/iQue装置进行荧光测量。在孵育步骤之间,不需要洗涤。使用“ForeCyt”软件评估原始数据。在数据采集后,来自每个样品的细胞系根据它们的荧光特征进行鉴定,并单独评估抗

体结合。结果以在CHO-hDAP12-hTREM2上的IgG滴定显示,并且CHO-hDAP12-mTREM2细胞用于确定EC50值。

[0822] 表位分箱(binning)

[0823] 通过Octet进行时间分辨的表位分箱

[0824] 在Octet(QK384或HTX)仪器上进行时间分辨的表位分箱以将IgG样品分类成相同的或显著重叠的表位的组(即能够抑制彼此结合的抗体)。至于如上所述针对通过经由SPR(Biacore)的无标记动力学的KD确定所应用的K_D确定,相同样品是先决条件。每个亲本家族选择一个代表候选物。

[0825] 在全因子测定设计中成对测试抗体样品,例如,对于两个抗体样品A和B,需要以下成对结合事件:A-A、A-B、B-A、B-B。对于"夹心"测定设置中的表位分箱,用样品组中存在的所有不同抗体样品修饰Octet传感器尖端。应用中到高的固定水平。携带不同抗体的传感器加载单体抗原,随后经受抗体样品之一,以检查与捕获的抗原的结合。如果第二抗体识别不同的表位,才预期发生另外的结合。

[0826] 为了评估,监测抗原加载和二抗结合结束时的信号,并根据足够的抗原加载和可能的抗原解离检查曲线。对于对照,即相同抗体(A-A,B-B)的双重结合步骤;对于第二抗体,预计没有另外的结合。比较所有不同抗体样品对的双重结合事件的一致性,例如,如果在样品顺序A-B(不同表位)中观察到B的另外的结合,则预期样品顺序B-A也导致A的另外的结合。造成这种不一致的可能原因是例如部分重叠的表位,或抗原的加载不足。结果显示在表12中。

[0827] 表12.表位分箱.

[0828]

MOR#	代表	亲本	分箱
MOR044721	MOR044727	MOR043962	A1
MOR044722	MOR044727	MOR043962	A1
MOR044724	MOR044727	MOR043962	A1
MOR044726	MOR044727	MOR043963	A1
MOR044693	MOR044747	MOR042493	A3
MOR044694	MOR044747	MOR042493	A3
MOR044702	MOR044747	MOR042493	A3
MOR044746	MOR044747	MOR042493	A3
MOR044695	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044728	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044734	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044737	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044738	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044739	MOR044730	MOR042556	A1
MOR044697	MOR044707	MOR042596	AB
MOR044698	MOR044707	MOR042596	AB
MOR044705	MOR044707	MOR042596	AB
MOR044708	MOR044707	MOR042596	AB

MOR044713	MOR044715	MOR042752	A3
MOR044716	MOR044715	MOR042752	A3
MOR044710	MOR044709	MOR042765	A3
MOR044717	MOR044709	MOR042765	A3
MOR044720	MOR044709	MOR042765	A3

[0829] 内化测定

[0830] 为了分析抗体-受体复合物的内化,使用人Fc特异性pHrodo标记的Fab("MorpHin")。MorpHin与分析的抗体结合,并且在靶识别和内化后,可以通过在酸性环境(溶酶体区室)中上升的红色荧光信号(发射最大值:566nm-590nm)检测抗体复合物。

[0831] 将CHO-hDAP12-hTREM2细胞接种在96孔板(50μl/孔,4.0E+05个细胞/ml)中,并使其在37℃和5% CO_2下附着过夜。第二天,将板在冰上冷却30-60分钟。将IgG(培养基中40nM)与200nM pHrodo标记的Fab MorpHin(各70μl)在37℃预孵育30分钟,随后在冰上冷却15分钟,然后将50μl的每种混合物添加至细胞并且在37℃和5% CO_2下孵育6小时。用DPBS(100μl/孔)洗涤细胞两次后,使用Accutase(50μl/孔,20-30分钟,37℃,5% CO2)分离细胞。添加150μl洗涤缓冲液(DPBS+/3% FBS/0.02% NaN_3)后,将细胞离心并重悬于100μl洗涤缓冲液中。使用FACS阵列装置(96孔,532nm,黄色/PE-通道)测量荧光,并使用FlowJo软件分析结果。MOR03207用作阴性对照。结果显示在表13中。

[0832] 表13.6小时后与对照(MOR03207)或对应的亲本IgG相比,抗体结合后TREM2的内化。

[0833]

MOR#	亲本	内化;6小时后相比于背景的倍数	6小时后与亲本相比的内化
MOR044721	MOR043962	19.6	0.3
MOR044722	MOR043962	18.1	0.3
MOR044724	MOR043962	5.5	0.1
MOR044726	MOR043963	26.1	0.5
MOR044693	MOR042493	33.5	0.7
MOR044694	MOR042493	37.2	0.8
MOR044702	MOR042493	40.1	0.8
MOR044746	MOR042493	33.3	0.7
MOR044695	MOR042556	39.4	0.9
MOR044728	MOR042556	32.2	0.7
MOR044734	MOR042556	34.9	0.8
MOR044737	MOR042556	29.3	0.6
MOR044738	MOR042556	33.7	0.7
MOR044739	MOR042556	30.2	0.7
MOR044697	MOR042596	30.0	0.8
MOR044698	MOR042596	57.1	1.5

[0834]

MOR044705	MOR042596	62.4	1.6
MOR044708	MOR042596	36.6	0.9
MOR044713	MOR042752	34.5	1.0
MOR044716	MOR042752	33.4	0.9
MOR044710	MOR042765	37.6	1.2
MOR044717	MOR042765	35.4	1.1
MOR044720	MOR042765	37.2	1.1

[0835] 稳定化测定-在CHO-hDAP12-hTREM2上PMA诱导的脱落

[0836] 为了研究开发的IgG稳定细胞表面上的TREM2受体对抗PMA诱导的脱落的能力,将CHO-hDAP12-hTREM2细胞用于基于FACS的稳定化测定。为了避免PMA失活,将抗体和对照在无叠氮化物的测定缓冲液中稀释(终浓度200nM和20nM),并与预冷却的细胞($5.0x10^4$细胞/孔,在无叠氮化物的测定缓冲液中稀释)以300rpm振荡在30℃下孵育45分钟。添加终浓度为50ng/ml的脱落酶刺激物PMA并与细胞-抗体-混合物以300rpm振荡在4℃下孵育30分钟。洗涤后,通过与荧光标记的检测抗体(山羊抗人IgG-Alexa 647;小鼠抗山羊IgG-Alexa 647)在4℃孵育1小时来检测结合的IgG。使用ForeCyt软件在iQUE装置上(384孔,约37μL,西普时间(sip time)1秒)测量荧光。

[0837] 稳定性测定-在CHO-hDAP12-hTREM2上的组成型脱落

[0838] 为了研究开发的IgG稳定细胞表面上的TREM2受体的能力,将CHO-hDAP12-hTREM2细胞以及亲本细胞系CHO-hDAP12用于基于FACS的稳定化测定。将$3.0x10^4$个细胞/孔转移到96孔细胞培养板的孔中,并使其在37℃和5% CO_2下附着约5-6小时。将IgG和对照抗体(MOR03207,多克隆山羊抗-hTREM2抗体(R&D系统公司(R&DSystems);AF1828))在培养基中稀释,并以100nM和10nM的终浓度加入细胞中。脱落酶抑制剂DPC 333用作阳性对照(培养基中5μM)。将细胞培养板在37℃和5% CO_2下孵育过夜。

[0839] 第二天,除去上清液,用50μL accutase/孔在37℃和5% CO_2下分离粘附细胞约20-30分钟。洗涤后,通过与荧光标记的检测抗体(山羊抗人IgG-Alexa 647;小鼠抗山羊IgG-Alexa 647)在4℃孵育1小时来检测结合的IgG。使用ForeCyt软件在iQUE装置上(384孔,约37μL,西普时间(sip time)2秒)测量荧光。

[0840] 前导候选物

[0841] 对57个成熟的IgG的深入表征后,选择23个克隆作为前导候选物。表14列出了23个候选物的概况。

[0842] 表14.前导候选物.

[0843]

MOR#	亲本	类型	框架	结构域	sDAS 风险	SET K_D [pM] 人	SET K_D [pM] 食蟹猴	小鼠交叉反应	TREM2 活化（在 RGA 方面的倍数）	稳定 Mph-FACS	吞噬作用增强	工程化
44693	42493	稳定性抗体	VH6 κ1	IgSF	培养基	2	4	弱	1.5	++	+	无
44694			VH6 κ1	IgSF	低	9	4	+	1.3	++	++	无
44702			VH6 κ1	IgSF	低	5	4	+	1.6	++	++	无
44746			VH6 κ1	IgSF	低	3	4	+	1.3	++	++	无
44695	42556		VH6 κ1	IgSF	培养基	15	1*	弱	n.d.	++	+	PTM 去除
44728			VH6 κ1	IgSF	低	2	1	+	1.1	++	++	PTM 去除
44734			VH6 κ1	IgSF	培养基	5	1	+	1.1	++	++	PTM 去除
44737			VH6 κ1	IgSF	培养基	3	1	+	1.1	++	+	PTM 去除
44738			VH6 κ1	IgSF	培养基	3	1	+	1	++	++	PTM 去除
44739			VH6 κ1	IgSF	培养基	4	2	+	1.1	++	++	PTM 去除
44697	42596		VH1B κ1	IgSF	低	57	56	弱	n.d.	++	+	无
44698			VH1B κ1	IgSF	低	46	39	弱	1	++	++	无
44705			VH1B κ1	IgSF	低	12	6*	+	1	++	++	无
44708			VH1B κ1	IgSF	高	15	7	+	n.d.	++	++	无
44721	43962/3		VH1A κ1	IgSF	培养基	5	10	+	0.9	+	++	无
44722			VH1A κ1	IgSF	培养基	8	13	+	0.9	+	++	无
44724			VH1A κ1	IgSF	培养基	85	130	+	1.7	+	++	无
44726			VH1A κ1	IgSF	培养基	9	16	+	0.9	+	+	无
44713	42752	活化性抗体	VH1A κ1	IgSF	低	11	4	弱	n.d.	+	+	无
44716			VH1A κ1	IgSF	低	150*	100	弱	2	+	++	无
44710	42765		VH5 λ2	IgSF	培养基	27	26	+	2.3	++	+	种系化
44717			VH5 λ2	IgSF	低	18	33	+	n.d.	+	无	种系化
44720			VH5 λ2	IgSF	培养基	8	10	+	n.d.	+	++	种系化

[0844] *由于异常值或高浓度应用的IgG导致的KD限制

[0845] 对于“稳定化Mph-FACS”和“吞噬作用增强”栏,分别用+和++表示中等和强烈满足所需标准。

[0846] 实例2:抗TREM2抗体对细胞表面TREM2的稳定

[0847] 材料和方法

[0848] 溶液平衡滴定(SET)

[0849] 溶液中的亲和力测定基本上如文献(Friguet,B等人J Immunol Methods[免疫方法杂志],1985.77(2):第305-319页)中所述进行。为了改善SET方法的灵敏度和准确度,将其从经典ELISA转移到基于ECL的技术(Haenel,C等人Anal Biochem[生物化学年鉴],2005.339(1):第182-184页)。

[0850] 根据制造商的说明书,用MSD Sulfo TAGTM NHS-酯(Meso Scale Discovery公司|盖瑟斯堡|马里兰州|美国)标记1mg/mL山羊抗人Fab片段特异性抗体(Bethyl)。

[0851] 实验在聚丙烯微量滴定板和含有0.5% BSA和0.02%吐温20的PBS(GIBCO 14190|pH 7.0-7.2)作为测定缓冲液中进行。制备未标记抗原的系列稀释液,起始浓度至少比预期

的K_D高至少10倍。没有抗原的孔用于确定Bmax值;仅含有测定缓冲液的孔用于确定背景。在添加适量的结合物(抗体浓度类似于或低于预期的K_D,60μL终体积)后,将混合物在室温下孵育过夜。

[0852] 将MSD板用PBS中的3% BSA封闭,并在链霉亲和素板(30μL/孔)上用生物素化抗原(hTREM2 ECD(19-174)-hFc-bio)包被。用含有0.05%吐温20的PBS洗涤板后,将平衡的样品转移到板中并孵育20分钟。孵育后,将30μL/孔的MSD-Sulfo-标记的检测抗体(抗人Fab|最终稀释液通常为1:2,000)加入洗涤的MSD板中,并在室温下在Eppendorf振荡器(700rpm)上孵育60分钟。

[0853] 在洗涤MSD板并添加30μL/孔MSD读数缓冲液T和表面活性剂后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery公司,盖瑟斯堡,马里兰州,美国)检测电化学发光信号。

[0854] 使用应用定制的拟合模型的XLfit(IDBS)软件评估数据。对于Fab分子的K_D测定,使用根据Haenel,2005的拟合模型(Haenel,C等人Anal Biochem[生物化学年鉴],2005.339(1):第182-184页)。对于IgG分子和单体抗原的K_D测定,使用IgG的拟合模型,根据(Piehler,J等人JImmunol Methods[免疫方法杂志],1997.201:第189-206页)进行修饰。对于方程也参考(Della Ducata,D等人J Biomol Screening[生物分子筛选杂志],2015.20(10):第1256-1267页)。SET筛选(Della Ducata,D等人J Biomol Screening[生物分子筛选杂志],2015.20(10):第1256-1267页)原则上如上所述进行。为了通过溶液平衡滴定对成熟的结合物进行分级,基于Haenel及其同事描述的原理应用模型(Haenel,C等人Anal Biochem[生物化学年鉴],2005.339(1):第182-184页)。将恒定量的稀释的BEL提取物(含有硼酸盐缓冲液,EDTA和溶菌酶)用不同浓度的抗原平衡过夜。

[0855] 然后将混合物转移至预先用抗原包被的MSD板,并在孵育和洗涤后,添加合适的MSD-Sulfo-标记的检测抗体。

[0856] 随后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery公司|盖瑟斯堡|马里兰州|美国)通过ECL检测定量未结合的Fab的浓度。

[0857] 使用XLfit(IDBS)软件(应用如上所述的相应拟合模型)处理结果,以估计亲和力并且从而鉴定通过成熟最大程度改善的克隆。

[0858] 经由SPR(Biacore)通过无标记动力学测定K_D

[0859] 对于K_D测定,使用抗体蛋白(IgG)的单体级分(至少90%单体含量,如通过分析型SEC分析)。

[0860] 通过如下所述的SPR(Biacore T200)仪器进行通过测定动力学速率常数的亲和力测定。

[0861] 经由抗体捕获设置确定K_D

[0862] 制备合适的高容量捕获表面,例如,通过使用EDC/NHS化学将适当的捕获配体共价固定到CM5芯片(Biacore,通用电气医疗集团)上。合适的捕获系统的实例是抗hu-Fc抗体(Biacore|通用电气医疗集团)或MabSelect SuRe配体(通用电气医疗集团)。

[0863] 对于Fab片段的K_D测定,将hTREM2 ECD(19-174)-hFc作为配体捕获,并且Fab片段用作溶液中的分析物。对于IgG样品的K_D测定,将IgG作为配体捕获,单体TREM2蛋白用作溶液中的分析物(例如hTREM2 ECD(19-174)-His、mTREM2 ECD(19-168)-His、或cyTREM2ECD

(19-174)-APP-Avi)。

[0864] 在动力学实验期间,使用六个至八个不同的分析物浓度(例如2倍连续稀释)进行分析。在每个循环后,再生传感器表面以除去捕获的抗体/抗原复合物,同时保持捕获表面的完整性。使用空白注入的运行缓冲区进行参考。

[0865] 数据的评估

[0866] 用相应仪器的评估软件(即Biacore T200评估软件2.x或3.x(Biacore,通用电气医疗集团))分别评估传感图。将所有传感图拟合到1:1结合模型以确定kon和koff速率常数,其用于计算K_D)。

[0867] 蛋白质组谱分析(3P)

[0868] 对于蛋白质组分析(Frese,K.et al.mAbs,2013.5(2):第279-287页),将32种不同的蛋白质和对照以1.0μg/mL的浓度在4℃在两个384孔MSD标准板上包被过夜。

[0869] 弃去包被溶液,用PBS中的50μL 3%(w/v)BSA在微量滴定板振荡器(约500rpm)上在室温下封闭板1小时,然后用50μL洗涤缓冲液(含0.05%(v/v)吐温20的PBS)进行三次洗涤步骤。

[0870] 将抗体样品(Fab片段或IgG)在测定缓冲液(含0.5%(w/v)BSA、0.05%(v/v)吐温20的PBS)中稀释至100nM和10nM。作为对照,使用MOR参考mAb抗溶菌酶MOR03207 Fab或IgG(取决于样品形式)和测定缓冲液。以30μL/孔添加样品和对照,并在微量滴定板振荡器上于室温孵育3小时。

[0871] 将板洗涤三次并每孔添加30μL检测抗体(ECL标记的抗人Fab)并在微量滴定板振荡器(约500rpm)上孵育一小时。在洗涤MSD板并添加35μL/孔MSD读数缓冲液T和表面活性剂后,使用Sector Imager6000(Meso Scale Discovery公司,盖瑟斯堡,马里兰州,美国)检测电化学发光信号。

[0872] 为了评估,将特定蛋白质上的抗体样品的信号除以参考mAb MOR03207的对应信号,得到结合比(BR)。然后计算除对照之外的所有蛋白质(总共25个)的累积结合比(CBR)。

[0873] 使用人质膜蛋白细胞阵列进行结合谱评估

[0874] 背景筛选

[0875] 将人HEK293细胞在载玻片上生长并固定。以2μg/ml添加测试抗体。随后将载玻片与AlexaFluor647标记的抗人IgG Fc检测抗体一起孵育,然后进行荧光成像。该检测抗体之前已经过验证,可用于Retrogenix系统中检测人IgG和人Fc融合蛋白。

[0876] 初级筛选:

[0877] 将编码ZsGreen1和全长人质膜蛋白的4955个双顺反子表达载体一式两份点样到载玻片上,并且将人HEK293细胞进行反转染(14个载玻片组/抗体)。在筛选的4955个人质膜蛋白中,超过3500个是独特的基因。

[0878] 在细胞固定后向每个载玻片中添加测试抗体,并通过使用与预筛选中使用的相同的荧光二抗进行结合检测。ZsGreen1荧光信号用于确认正确的转染并定位转染细胞的斑点。蛋白质“命中”被定义为显示与背景水平相比的升高信号(Alexa 647通道)的一式两份斑点。这是通过使用ImageQuant软件上网格化的图像进行目视检查来实现的。根据一式两份斑点的强度,命中被分类为“强、中、弱或非常弱”。

[0879] 细胞系

[0880] 根据标准细胞培养程序产生表达hTREM2和hDAP12蛋白的CHO细胞系。用含有人hDAP12和hTREM2的cDNA的真核表达载体依次转染CHO细胞。得到的CHO-hTREM2/hDAP12双转染细胞(CHO-hTREM2)在补充有10％胎牛血清、0.2mg/ml G418和0.2mg/mL潮霉素的DMEM/F12培养基中生长。通过细胞解离缓冲液(Gibco13151-014)收获汇合的CHO细胞,并通过如下所述的流式细胞术定量细胞表面TREM2。类似地,产生CHO克隆细胞系,其重组表达hDAP12和小鼠TREM2或hDAP12和食蟹猴TREM2。

[0881] 使用标准克隆程序产生嵌合人TREM2-人TREM1构建体。TREM2-IGSF-TREM1茎构建体含有TREM2的IGSF结构域、TREM1的茎区、随后是TM和TREM2的细胞内结构域。TREM1-IGSF-TREM2茎构建体含有TREM1的IGSF结构域,TREM2的茎区,随后是TM和TREM2的细胞内结构域。使用针对TREM2的uniprot Q9NZC2和针对TREM1的Q9NP99确定结构域边界。从每个构建体产生稳定的克隆细胞系,其稳定表达嵌合构建体和hDAP12。使用细胞解离缓冲液(Gibco13151-014)收获汇合的贴壁CHO细胞克隆,并通过如下所述的流式细胞术定量细胞表面表达的嵌合hTREM2茎-hTREM1-IGSF或TREM1-IGSF-TREM2茎。

[0882] Kleinberger et al.2014(Kleinberger,G等人Sci Transl Med[科学转化医学],2014.6(243):p.243ra86)首次描述了稳定表达由TREM2-细胞外结构域和DAP12组成的嵌合受体的HEK细胞系。类似地,诺华公司的科学家根据标准细胞培养程序产生表达人TREM2/DAP12嵌合受体的细胞系。

[0883] THP1细胞是内源性TREM2和DAP12表达的人单核细胞。根据标准细胞培养程序用NFAT启动子驱动的萤光素酶基因转染这些细胞。在有限稀释后,用PMA/离子霉素刺激克隆,并选择一个克隆(THP1-B5),其显示报告基因活性(RGA)增加超过10倍。

[0884] 巨噬细胞产生

[0885] 根据制造商的方案,使用easySep™人单核细胞分离试剂盒(干细胞技术公司(Stemcell technologies))通过阴性选择从完全匿名的血沉棕黄层中分离人单核细胞。单核细胞在RPMI(补充有10％的胎牛血清,谷氨酸(1x,Gibco,61870-044),丙酮酸钠(Gibco,11360-070),非必需氨基酸,含MCSF 40ng/mL的HEPES(R&D系统公司,216-MC-025),和50ng/mL IL4(R&D系统公司,204-IL-050)分化培养基)中经过5-6天分化为hM2A。用细胞解离缓冲液(Gibco 13151-014)收获M2A巨噬细胞,并通过如下所述的流式细胞术评估细胞表面TREM2。对于大多数实验,在来自两个不同供体的血沉棕黄层上平行评估抗体。

[0886] FACS

[0887] 为了测定hM2A、CHO-hTREM2或CHO-cynoTREM2上的抗体的细胞EC_{50},用5μM DPC333(ADAM10和ADAM17抑制剂;Qian,M等人Drug Metab Dispos[药物代谢和处置],2007.35:第1916-1925页)处理细胞。用accutase(Biolegend公司,423201)分离巨噬细胞,然后重悬浮于补充有50μg/ml Fc封闭(BD,564220)的FACS缓冲液(PBS,2％FBS,0.5mM EDTA,pH 8.0)中并在冰上孵育至少20分钟。接下来将细胞在4℃在相同缓冲液中用宽浓度范围的不同抗TREM2抗体染色1小时,然后是用PBS的洗涤步骤(250g,4℃,3min)。接下来将细胞在FACS/Fc封闭缓冲液中与AlexaFluor®647AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG、F(ab')2片段(杰克森免疫研究公司(Jackson Immuno Research),109-606-097)和LIVE/DEAD®可固定Aqua死细胞染色试剂盒(用于在405nm激发)(分子探针公司(Molecular Probes),L34966)一起在4℃下孵育30分钟。在用PBS(250g,4℃,3分钟)进行第二洗涤步骤后,将细胞

用固定缓冲液(Biolegend公司,420801)在室温下固定15分钟,再次洗涤并使用BD FACS Canto II(BD,V96300323)或FacsCalibur流式细胞仪评估荧光。使用FlowJo软件(Millipore INC公司)评估对应于与细胞结合的TREM2抗体的程度的中值荧光强度。

[0888] 稳定性测定-在CHO-hDAP12-hTREM2上的组成型脱落

[0889] 为了研究开发的IgG稳定细胞表面上的TREM2受体的能力,将CHO-hDAP12-hTREM2细胞以及亲本细胞系CHO-hDAP12用于基于FACS的稳定化测定。将3.0x10^4个细胞/孔转移到96孔细胞培养板的孔中,并使其在37℃下在细胞培养箱中附着约5-6小时。将IgG同种型对照和对照抗体(MOR03207,多克隆山羊抗-hTREM2抗体(R&D系统公司;AF1828))在培养基中稀释,并以如图中所示的最终浓度加入细胞中。脱落酶抑制剂DPC333用作阳性对照(培养基中5μM)。将细胞培养板在37℃下在细胞培养箱中孵育。

[0890] 第二天,除去上清液,用50μL accutase/孔在37℃和5% CO2下分离粘附细胞约20-30分钟。洗涤后,通过与荧光标记的检测抗体(山羊抗人IgG-Alexa 647;小鼠抗山羊IgG-Alexa 647)在4℃孵育1小时来检测结合的IgG。使用ForeCyt软件在iQUE装置上(384孔,约37μL,西普时间(sip time)2秒)测量荧光。可替代地,通过使用非交叉封闭MOR041895Fab片段,实现独立于稳定性抗体的TREM2的直接检测。

[0891] 抗TREM2抗体对hM2A上表达的TREM2的稳定

[0892] 将M2A分化的巨噬细胞用accutase(Biolegend公司,423201)分离,用PBS洗涤一次,然后在补充有50μg/ml Fc封闭剂(Fab片段抗Fc受体,由诺华公司生产)的FACS缓冲液(PBS,2% FBS,0.5mM EDTA,pH 8.0)中重悬浮,并在室温下孵育至少20分钟。接下来将抗TREM2抗体添加至细胞(图中所示浓度),然后在37℃的细胞培养箱中孵育24小时。在第二天,将细胞进行FACS分析。FACS染色通过用于稳定的抗TREM2抗体的直接染色来完成,或通过用抗TREM2 Fab-His片段(MOR041895)染色来完成,该片段识别在TREM2处的与用于稳定的抗体有关的不同的非重叠表位。M2A巨噬细胞用PBS/1mM EDTA洗涤两次以去除多余的血清,再用FACS缓冲液洗涤一次,然后添加50μg/ml Fc封闭剂(BD,564220)。为检测用于稳定化的结合的抗TREM2抗体,添加AlexaFluor®647AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG、F(ab')2(杰克森免疫研究公司(Jackson Immuno Research),109-606-097)和LIVE/DEAD®可固定Aqua死细胞染色(分子探针公司(Molecular Probes),L34966)于冰上置30分钟。为直接染色TREM2,在冰上用His标记的Fab片段MOR041895(100nM)处理另一个样品10分钟,然后添加抗His PE(美天旎公司(Miltenyi),130-092-691)和LIVE/DEAD®固定Aqua死细胞染色(分子探针公司,L34966)。在冰上放置30分钟后,将细胞用FACS缓冲液洗涤一次,然后在室温下用固定缓冲液(Biolegend,420801)固定15分钟,再次洗涤,并使用BD FACS Canto II(BD,V96300323)或FacsCalibur流式细胞仪评估荧光。使用FlowJo软件(Millipore INC公司)评估对应于与细胞结合的Fab片段的TREM2抗体的程度的中值荧光强度。

[0893] 吞噬作用测定(FACS)

[0894] 将M2A分化的巨噬细胞用accutase(Biolegend,423201)分离,并接种于组织培养板中的补充了Fc封闭剂(20μ/ml)的分化培养基中。在37摄氏度的加湿细胞培养箱中培养2.5小时后,将抗体以图中所示的浓度添加至巨噬细胞,并在37摄氏度的加湿细胞培养箱中再孵育18小时。除去细胞培养基,巨噬细胞用PBS洗涤两次并重悬于分化培养基中。接下来,

添加相同体积的补充有pHrodo红金黄色葡萄球菌生物颗粒(吞噬作用共轭物,分子探针公司,A10010)的分化培养基,并将溶液离心(1分钟,500g)以同步吞噬作用,然后在37摄氏度的加湿细胞培养箱中孵育2.5小时。将细胞用PBS洗涤两次,用accutase分离,再在冰上用FACS缓冲液洗涤,并在冰上在FACS缓冲液中重悬,然后在FACS Canto II(BD)上进行FACS分析。使用FlowJo软件(Millipore INC)评估与细胞摄取吞噬作用程度相对应的中值荧光强度。实验始终包括具有相同Fc沉默突变的同种型对照(MOR03207)抗体。该抗体不识别hM2A巨噬细胞上的表位。

[0895] 吞噬作用测定(Incucyte)

[0896] 用accutase StemPro(Gibco#A11105-01,Lot#1648949)分离人M2A分化的巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞,并将其悬浮在M2a巨噬细胞完全培养基中。除去细胞培养基,并将细胞重悬浮于RPMI+0.5% FCS中。将50μL制备的细胞悬浮液接种到96孔黑色透明板、聚-D-赖氨酸、BD板的每个插入物中(7500(M2A)-10000(iPS衍生的小胶质细胞)个细胞/孔),并在37℃下粘附3小时。添加pHrodo标记的生物颗粒(或者:pHrodoGreen金黄色葡萄球菌生物颗粒-埃森生物科学公司(Essen Bioscience)#4620或pHrodoGreen标记的凋亡SH-SY5Y细胞(1.2x 10^5个细胞/孔)),并将板转移到IncuCyte ZOOM平台中(该平台位于37℃/5% CO_2的细胞培养箱内),直到测定结束。使用10倍物镜每30分钟对来自三个技术重复的每个孔拍摄两张图像,持续20小时,然后使用IncuCyteTM Basic软件进行分析。

[0897] 趋化性测定(Incucyte)

[0898] 将M2A分化的巨噬细胞或人iPS衍生的小胶质细胞以5000(M2A巨噬细胞)或7500(iPS衍生的小胶质细胞)个细胞/孔接种至预包衣基质胶(GFR-康宁公司#354230Lot:631008)的transwell板(埃森生物科学公司)中的完全培养基中。对于采用抗体处理的迁移分析,以100nM补充了小胶质细胞每种抗TREM2抗体,或以100nM补充了相应的同种型对照。将Transwell放入含有200μl具有20ng/ml重组C5a或100ng/ml重组C5a的完全培养基的储器板中。使用Incucyte S3®软件(埃森生物科学公司)监测和分析Transwell迁移。

[0899] 报告基因测定

[0900] 为了刺激RGA活性,将全长抗体以10μg/ml的浓度包被在高蛋白结合细胞培养板(葛莱娜公司(Greiner)#781094)上8-16小时。洗涤板后,将已经用DPC333在完全培养基中处理16小时的THP-B5细胞接种在抗体包被的384孔板上16小时。接下来,根据制造商的说明(Steadylite plus萤光素酶检测试剂,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),#6066751),使用steadylite plus测定萤光素酶活性。结果表示为相对于对照Ab(IgG同种型)的刺激倍数。

[0901] Syk磷酸化测定

[0902] 将2×10^6个人M2A巨噬细胞/孔接种在6孔培养皿中的含有2μMDPC333的培养基中。24小时后,将细胞用PBS洗涤一次,并添加测定缓冲液(补充有1% FCS、10mM HEPES、2μM DPC333和50μg/ml抗Fc Fab封闭剂的RPMI)。将细胞在37摄氏度孵育4小时。接下来从培养箱中取出细胞,置于冰上,并用冰冷的PBS洗涤一次。然后添加1ml含有同型对照抗体或抗TREM2抗体(100nM)的测定缓冲液。还包括市售的抗TREM2抗体(大鼠单克隆IgG2B,R&D公司,MAB17291)。在冰上继续孵育18分钟。此后,去除培养基,并用冰冷的PBS洗涤细胞以去除多余的、未结合的TREM2抗体。然后添加1ml不带抗Fc封闭剂但补充了100nM交联抗体(对于大鼠抗TREM2一抗:杰克森免疫研究公司#112005008,山羊抗大鼠IgG Fc-γ片段;对于人抗

TREM2抗体:杰克森免疫研究公司#109-005-008,山羊抗人IgG Fc-γ片段)的预热的测定缓冲液。在37℃下继续孵育10分钟。接下来将板放在冰上,用冷PBS和补充有蛋白酶/磷酸化终止剂(赛默飞世尔科技公司(Thermo scientific),#1861281,终止蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物;1:100)的冷裂解缓冲液(800μl/孔;赛默飞世尔科技公司,#78501,M-PER哺乳动物蛋白提取试剂)洗涤一次。细胞裂解进行5分钟,然后在4℃下以10'000g离心20分钟。将上清液与抗syk抗体(细胞信号传导公司(Cell Signaling),克隆D3Z1E-XP,#13198;2.45μg/ml)在室温下伴随轻轻搅拌孵育1小时。将50μl蛋白A/G珠(赛默飞世尔科技公司,#88802)添加到每个样品中,并在室温轻轻搅拌下继续孵育1小时。接下来将样品放入磁体(赛默飞世尔科技公司)中,并除去上清液。将珠用PBS-T(PBS+0.1%吐温20)洗涤3次,并用30μl 1x WB上样染料(NuPAGE,LDS上样缓冲液Novex,NP0008)洗脱结合的蛋白。

[0903] 接下来将样品在70摄氏度下加热10分钟,用磁体分离,并将25μl的每个样品上样至4-12%的凝胶(NuPAGE 4-12% Bis-Tris Midi蛋白凝胶,10孔,Novex,WG1403BOX),使用MES(NuPAGE MES,Novex,NP0002)作为运行缓冲液。将蛋白质转移到PVDF膜上,并用3%TopBlock缓冲液(LuBio,在PBS-T 0.1%中)封闭膜1小时,然后与抗磷酸-酪氨酸AB 4G10(小鼠单克隆,Millipore公司#05-1050)在4℃孵育过夜。洗涤膜,并在室温与clean blot抗体(Clean-Blot,IP检测试剂(HRP),21230)一起孵育1小时,然后进行另一个洗涤步骤,并根据制造商的说明用ECL(ECL选择试剂,通用电气医疗集团,RPN 2235)进行检测。

[0904] 为检测总Syk,用Restore剥离缓冲液处理膜,然后使用兔抗人Syk抗体(细胞信号传导公司#2712)和clean blot检测试剂检测总Syk。

[0905] 人TREM2的CRISPR敲入(KI)(hTREM2 KI)

[0906] 人源化的TREM2小鼠是通过CRISPR将包含牛生长激素聚A信号的人TREM2 cDNA(同种型1,UniProt:Q9NZC2-1)引入小鼠TREM2基因的外显子1的ATG产生的。通过PCR筛选建立者动物的hTREM2表达并将其繁殖为纯合子。骨髓来源的巨噬细胞由不同的建立者动物产生,并且hTREM2的表达以及小鼠TREM2的缺乏均通过FACS分析得以证实。选择一个建立者系并对其进行TREM2基因座的序列分析,以验证TREM2 cDNA是否正确插入基因组。

[0907] 人源化TREM2 Crispr敲入小鼠的铜宗模型

[0908] 铜宗模型中鼠源化MOR44698 TREM2抗体的预防/伴随治疗

[0909] 铜宗模型是一种毒素诱导的脱髓鞘模型,用于研究CNS的髓鞘形成过程,其中外周免疫系统的参与很小。铜宗(一种铜螯合剂)诱导线粒体损伤,并最终诱导少突胶质细胞死亡,而少突胶质细胞前体细胞不受影响,并且仍可以发挥其正常功能(增殖、成熟和再髓鞘化)。铜宗在啮齿动物中引起的中毒会诱导神经炎症、神经元损伤和脱髓鞘,然后恢复。铜宗模型非常适合用于测试脱髓鞘疾病的再生治疗范例,例如比如独立于侵袭性外周免疫细胞而增强髓鞘再生的MS。

[0910] 治疗人源化的TREM2 Crispr敲入小鼠(hTREM-KI)(食物中0.2%)用铜宗(双(环己酮)草酸二腙,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))处理共7周,其中在之前1天和之后每周两次用44698和同种型对照MOR03207(简称:3207)i.p.,30mg/kg处理。在研究过程中,进行了纵向非侵入性磁共振成像(MRI),以测量磁化传递率(MTR)和强度/对比度,分别考虑用于检测髓磷脂和神经炎症。在用抗体和铜宗进行预防/伴随治疗7周后,处死动物并在冠状脑石蜡切片上进行组织学检查。Iba1抗体用于评估小胶质细胞数量和形态,并且Luxol快蓝

染色用于分析髓磷脂含量。

[0911] 铜宗模型中鼠源化MOR44698 TREM2抗体的治疗性治疗

[0912] 将hTREM-KI小鼠用铜宗(食物中0.2%)处理5周,然后换成正常食物,并用44698和同种型对照3207i.p.30mg/kg每周治疗两次,持续2周。在研究过程中,进行了纵向非侵入性磁共振成像(MRI),以测量磁化传递率(MTR)和强度/对比度。经过5周的铜宗中毒,用抗体进行2周的治疗性处理后,处死动物并在冠状脑石蜡切片上进行组织学检查。Iba1抗体用于评估小胶质细胞数量和形态,Luxol快蓝染色用于分析髓磷脂含量。

[0913] MRI:使用Biospec 70/30光谱仪(布鲁克医学系统公司(Bruker Medical Systems),埃特林根,德国)在7T下运行进行测量。扫描仪的操作软件为Paravision 5.1(Bruker)。使用小鼠脑圆极化线圈(布鲁克医学系统公司,型号1P T20063 V3;内径23mm)从麻醉的、自发呼吸的动物获得图像,用于射频激发和检测。既未应用心脏触发也未应用呼吸触发。在盒子中短时间引入后,用1.5%异氟烷(雅培公司(Abbott),卡姆(Cham),瑞士)在氧气中通过鼻锥给药使动物保持麻醉状态。在MRI信号采集期间,将动物以俯卧位置于由树脂玻璃制成的摇篮中,使用加热垫将体温保持在37±1℃,并监测呼吸。使用AT2加权的二维多层RARE(弛豫增强快速采集)序列来确定解剖学取向和评估信号强度。随后是二维多层梯度,称为FLASH(快速低角度拍摄)采集,用于评估MTR。由于两个序列具有相同的解剖学参数,因此在RARE图像上执行用于评估的目标区域的选择,然后将其转移到FLASH图像。使用ParaVision软件分析MRI图像。采集的参数如下:(a)RARE序列:有效回波时间80ms,重复时间3280ms,RARE因子16、12平均值,视场20x 18mm2,矩阵尺寸213x 192,像素尺寸0.094x 0.094mm2,切片厚度0.5mm,15个相邻切片。持续时间/带宽1ms/5400Hz和0.64ms/5344Hz的Hermite脉冲分别用于射频激发和重新聚焦。脂肪抑制通过2.61ms/1051Hz持续时间/带宽的高斯512脉冲,紧接着2ms长的梯度扰流器实现。总采集时间为7分52.3秒;(b)FLASH序列:回波时间2.8ms,重复时间252.8ms,4平均值,视场20x 18mm2,矩阵尺寸213x 192,像素尺寸0.094x 0.094mm2,切片厚度0.5mm,15个相邻切片。0.9ms/6000Hz持续时间/带宽和30°翻转角的Hermite脉冲用于射频激发。通过15ms/182.7Hz持续时间/带宽的高斯脉冲引入MTR对比度,其中射频峰值幅度为7.5μT,照射偏移为2500Hz。然后使用相同的参数重复采集,但不引入MTR对比度。然后使用公式MTR=(S0-SMTR)/S0计算MTR,其中S0和SMTR分别表示在没有和有MTR对比度引入的情况下FLASH采集中的信号强度。两组数据的总采集时间为6分31.6秒。

[0914] 在杀死动物之前,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行经心脏灌注,然后在某些情况下再用4%多聚甲醛(PFA)进行灌注。随后分离脑或半脑,并在4℃下在4% PFA中固定48小时。一些半脑被深冻。

[0915] 组织学:固定后,通过增加乙醇系列脱水处理脑进行石蜡包埋。在安装在SuperFrost+载玻片(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))上的3μm石蜡切片上进行石蜡切片的自动免疫组织化学,并使用Discovery XT技术公司(泛塔纳公司(Ventana)/罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))自动免疫染色。将切片脱石蜡、再水合,根据抗体通过用CC1细胞调理缓冲液加热28-68分钟进行抗原修复,在室温下根据抗体用抗体稀释剂(泛塔纳公司)稀释的一抗孵育1-3小时,与在抗体稀释液中稀释的相应生物素化的二抗一起孵育,使用DAB-Mab试剂盒反应并用苏木精II和上蓝剂试剂(泛塔纳公司)复染。在

热自来水中用肥皂洗涤载玻片,并在冷自来水下冲洗以除去肥皂,然后脱水并用Pertex包埋。对于LFB染色,将载玻片脱蜡并再水化为95％乙醇。然后将载玻片在LFB溶液(Solvent Blue 38(西格玛公司S3382)在95％乙醇和10％乙酸(西格玛公司695092)中)中于60℃孵育过夜,在95％乙醇中漂洗1分钟,然后在蒸馏水中漂洗2分钟并在0.05％碳酸锂中漂洗5秒。随后,将载玻片在70％乙醇中漂洗两次持续10秒,然后在蒸馏水中漂洗2分钟。在新鲜配制的0.05％碳酸锂(Merck 105680)、70％乙醇和蒸馏水中反复漂洗,直到白质(髓磷脂)的蓝色与无色灰质之间形成鲜明的对比。最后,将载玻片开始用95％乙醇脱水并固定在Pertex中。

[0916] 抗体:一抗是:兔抗小鼠MBP(Dako公司A0623)1:1000;兔抗小鼠GST-π(MBL 312)1:500;兔抗Iba1(和光纯药工业株式会社(Wako)019-19741,50μg/100μl)1:500;兔抗GFAP(Dako公司Z0334)1:5000;兔抗小鼠MOG(艾博抗公司(abcam)ab32760)1:100;兔抗dMBP(Millipore公司AB5864)1:3000;小鼠抗神经丝(科文斯公司(Covance)SMI312)1:5000;兔抗小鼠ALDH1L1(艾博抗公司ab87117)1:1000;兔抗小鼠NeuN(Milli-hole公司ABN78)1:2000;大鼠抗小鼠CD107a(伯乐公司MCA4707T)1:200;兔抗小鼠NG2(艾博抗公司ab129051)1:200;山羊抗Iba1(赛默飞世尔科技公司PA5-18039)1:250。二级检测抗体是:生物素化的山羊抗兔IgG(杰克森免疫研究公司111-065-144)1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司(Vector)BA-1000)1:200或1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司BA-9200)1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司BA-9400)1:200。

[0917] 组织学图像分析:基于来自组织学染色的脑切片的图像分析,对小胶质细胞/星形胶质细胞数量和形态进行定量评估,基于MS Visual Studio2010和来自Matrox MIL V9库(Matrox Inc公司)的许多功能开发了专有的图像分析平台(ASTORIA公司,自动存储图像分析(Automated Stored Image Analysis),诺华制药集团(Novartis Pharma AG))。为了检测和分析细胞体、近端和远端突起,执行以下步骤序列:1.用Aperio的Scanscope(莱卡生物系统集团(Leica Biosystems AG))以20倍的放大倍数扫描带有脑切片的载玻片,以评估(棕色)免疫组织化学染色的小胶质细胞(Iba1)或星形胶质细胞(GFAP)细胞体的近端和远端突起。2.根据以下步骤,使用ImageScope软件(V12.1.0.5029,Aperio,莱卡生物系统集团)处理每个图像:A:颜色反卷积以获得棕色染色而没有蓝色;B:通过阈值处理、形态学关闭、填充孔、打开和消除太小的对象,从白色背景中分割脑组织,从而产生有效组织和样本区域的二元掩模;C:基于在充分黑暗区域(指示细胞体)的颜色去卷积的棕色图像的蓝色通道的平均灰度值,对细胞体的单独分割进行自适应阈值化。计算的阈值用于二值化,并且在大小过滤之后产生细胞体掩模图像(在有效样本区域内);d:通过形态顶帽转换进行突起分割,其大小可以选择较薄的突起。再次应用自适应阈值分割突起(使用先前确定的棕色对象的灰度平均值),然后对顶帽图像进行二值化并对结果对象进行大小过滤;E:减去细胞体(也可能已经被顶帽阈值选择)以获得真实突起的图像掩模;F:最终使突起薄化用于长度计算;G:近端突起:使用预定义数量的细胞体扩张来定义近端细胞体的参考(标志物)区域,采用围绕细胞体中心的圆来定义近端突起的截止边界。然后,带有标志物的、在扩张的细胞体中的并受到圆形影响区限制的近端突起(“近端变薄的变薄的”集)在细胞体中心周围重建。通过“近端的变薄的突起”集中具有标志物的所有突起的重建,收集“最终近端突起”;H:将细胞体添加到近端突起中以获得一组“可见小胶质细胞”;I:远端突起:仅从近端突起重建

突起(即忽略背景中或来自不同聚焦平面的细胞体的突起),然后减去定义近端突起的圆形区域,以产生一组远端突起;J:在计算细胞体以及“可见小胶质细胞”(圆形参考区域内单个细胞体+近端突起复合体)的光密度时,使用局部背景(不可见小胶质细胞)作为参考;K:计算细胞体、近端和远端突起的形态特征(大小、形成因子、长度)。

[0918] 用CSF1R激酶抑制剂BLZ945的小胶质细胞消耗和群体恢复

[0919] BLZ945消耗模型可以评估抗TREM2抗体支持TREM2的营养活性的功效。

[0920] 集落刺激因子1受体(CSF1R)信号传导途径对于小胶质细胞存活至关重要。所述CSF1R激酶抑制剂BLZ945诱导小胶质细胞消耗,一旦移除BLZ945,小胶质细胞就会在脑中群体恢复。如前所述进行BLZ945处理和分析(Beckmann,N等人,Acta Neuropathol Commun[神经病理学通讯学报],2018.6(1))。

[0921] 动物用169mg/kg的BLZ945处理,每天一次(qd),每次口服(p.o.)10ml/kg至少持续5天。BLZ945在0.5%甲基纤维素水溶液和0.1%吐温-80中制备。让动物随意获取食物和水。

[0922] BLZ945处理之前(至少1天),期间(持续至少5天)或之后至少3天用抗体或同素异型对照每周一次30mg/kg腹腔内处理动物。在杀死动物之前,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行经心脏灌注,然后在某些情况下再用4%多聚甲醛(PFA)进行灌注。随后分离脑或半脑,并在4℃下在4% PFA中固定48小时。将一些半脑冷冻或新鲜放入冷PBS中。

[0923] 组织学:固定后,通过增加乙醇系列脱水处理脑进行石蜡包埋。在安装在SuperFrost+载玻片(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))上的3μm石蜡切片上进行石蜡切片的自动免疫组织化学,并使用Discovery XT技术公司(泛塔纳公司(Ventana)/罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))自动免疫染色。将切片脱石蜡、再水合,根据抗体通过用CC1细胞调理缓冲液加热28-68分钟进行抗原修复,在室温下根据抗体用抗体稀释剂(泛塔纳公司)稀释的一抗孵育1-3小时,与在抗体稀释液中稀释的相应生物素化的二抗一起孵育,使用DAB-Mab试剂盒反应并用苏木精II和上蓝剂试剂(泛塔纳公司)复染。在热自来水中用肥皂洗涤载玻片,并在冷自来水下冲洗以除去肥皂,然后脱水并用Pertex包埋。对于LFB染色,将载玻片脱蜡并再水化为95%乙醇。然后将载玻片在LFB溶液(Solvent Blue 38(西格玛公司S3382)在95%乙醇和10%乙酸(西格玛公司695092)中)中于60℃孵育过夜,在95%乙醇中漂洗1分钟,然后在蒸馏水中漂洗2分钟并在0.05%碳酸锂中漂洗5秒。随后,将载玻片在70%乙醇中漂洗两次持续10秒,然后在蒸馏水中漂洗2分钟。在新鲜配制的0.05%碳酸锂(Merck 105680)、70%乙醇和蒸馏水中反复漂洗,直到白质(髓磷脂)的蓝色与无色灰质之间形成鲜明的对比。最后,将载玻片开始用95%乙醇脱水并固定在Pertex中。

[0924] 抗体:一抗是:兔抗Iba1(和光纯药工业株式会社(Wako)019-19741,50μg/100μl)1:500;兔抗GFAP(Dako公司Z0334)1:5000;小鼠抗神经丝(科文斯公司(Covance)SMI312)1:5000;兔抗小鼠ALDH1L1(艾博抗公司ab87117)1:1000;兔抗小鼠NeuN(Milli-hole公司ABN78)1:2000;大鼠抗小鼠CD107a(伯乐公司MCA4707T)1:200;山羊抗Iba1(赛默飞世尔科技公司PA5-18039)1:250。二级检测抗体是:生物素化的山羊抗兔IgG(杰克森免疫研究公司111-065-144)1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司(Vector)BA-1000)1:200或1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司BA-9200)1:1000;生物素化的山羊抗兔IgG(载体公司BA-9400)1:200。

[0925] 组织学图像分析:基于来自组织学染色的脑切片的图像分析,对小胶质细胞/星形胶质细胞数量和形态进行定量评估,基于MS Visual Studio2010和来自Matrox MIL V9库(Matrox Inc公司)的许多功能开发了专有的图像分析平台(ASTORIA公司,自动存储图像分析(Automated Stored Image Analysis),诺华制药集团(Novartis Pharma AG))。为了检测和分析细胞体、近端和远端突起,执行以下步骤序列:1.用Aperio的Scanscope(莱卡生物系统集团(Leica Biosystems AG))以20倍的放大倍数扫描带有脑切片的载玻片,以评估(棕色)免疫组织化学染色的小胶质细胞(Iba1)或星形胶质细胞(GFAP)的近端和远端突起。2.根据以下步骤,使用ImageScope软件(V12.1.0.5029,Aperio,莱卡生物系统集团)处理每个图像:A:颜色反卷积以获得棕色染色而没有蓝色;B:通过阈值处理、形态学关闭、填充孔、打开和消除太小的对象,从白色背景中分割脑组织,从而产生有效组织和样本区域的二元掩模;C:基于在充分黑暗区域(指示细胞体)的颜色去卷积的棕色图像的蓝色通道的平均灰度值,对细胞体的单独分割进行自适应阈值化。计算的阈值用于二值化,并且在大小过滤之后产生细胞体掩模图像(在有效样本区域内);D:通过形态顶帽转换进行突起分割,其大小可以选择较薄的突起。再次应用自适应阈值分割突起(使用先前确定的棕色对象的灰度平均值),然后对顶帽图像进行二值化并对结果对象进行大小过滤;E:减去细胞体(也可能已经被顶帽阈值选择)以获得真实突起的图像掩模;F:最终使突起薄化用于长度计算;G:近端突起:使用预定义数量的细胞体扩张来定义近端细胞体的参考(标志物)区域,采用围绕细胞体中心的圆来定义近端突起的截止边界。然后,带有标志物的、在扩张的细胞体中的并受到圆形影响区限制的近端突起(“近端变薄的变薄的”集)在细胞体中心周围重建。通过“近端的变薄的突起”集中具有标志物的所有突起的重建,收集“最终近端突起”;H:将细胞体添加到近端突起中以获得一组“可见小胶质细胞”;I:远端突起:仅从近端突起重建过程(即忽略背景中或来自不同聚焦平面的细胞体的突起),然后减去定义近端突起的圆形区域,以产生一组远端突起;J:在计算细胞体以及“可见小胶质细胞”(圆形参考区域内单个细胞体+近端突起复合体)的光密度时,使用局部背景(不可见小胶质细胞)作为参考;K:计算细胞体、近端和远端突起的形态特征(大小、形成因子、长度)。

[0926] 人源化TREM2 Crispr敲入小鼠的MPTP模型

[0927] 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)是一种毒素,可在人中引起类似于帕金森病的症状。MPTP被星形细胞单胺氧化酶B代谢,生成活性代谢物1-甲基-4-苯基吡啶鎓(MPP+),其然后被神经元通过多巴胺(DA)转运蛋白(DAT)吸收。其中,MPP+在线粒体基质中积累并抑制呼吸链的复合物I,从而削弱线粒体ATP的生成。由于复合物I抑制,这种ATP消耗以及过量的活性氧(ROS)形成会导致细胞死亡。全身性MPTP施用可在小鼠中特异性诱导多巴胺能细胞死亡,这伴有增加的神经炎症。MPTP模型先前已有描述(Ren,M等人,Exp Neurol[实验神经学],2018.302:p.205-213)。

[0928] 将人源化的TREM2 Crispr敲入小鼠(hTREM-KI)用MPTP以15mg/kg腹腔注射4次处理1天,注射分隔2小时。在MPTP处理前一天、MPTP处理后两天和四天腹腔注射30mg/kg的44698和同种型对照MOR03207(简称:3207)。MPTP处理后7天,处死动物并在冠状脑自由漂浮切片上进行免疫荧光。酪氨酸羟化酶(TH)用抗体染色,显微拍照(10倍物镜),纹状体的染色面积用Fiji软件定量。

[0929] 在杀死动物之前,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行经心脏灌注,然后在某些情况下再

用4％多聚甲醛(PFA)进行灌注。随后分离脑或半脑,并在4℃下在4％ PFA中固定24-48小时。将一些半脑冷冻或新鲜放入冷PBS中。

[0930] 组织学:固定后,将脑包埋在PBS中的2％琼脂糖中,并产生自由漂浮的切片(至少20μm-30μm厚)。将切片转移至24孔板中,用PBS洗涤,并在2％(v/v)正常山羊或马血清(载体实验室公司(Vector Laboratories))中孵育1小时,该山羊或马血清在补充有1％(w/v)牛血清白蛋白(BSA)和0.3％(v/v)Triton X-100的PBS中(此处称为第1天缓冲液)。然后将切片在含有对应一抗(兔抗酪氨酸羟化酶(TH),Millipore AB152)的第1天缓冲液中放置过夜。第二天,将切片用补充有0.3％ BSA和0.1％ Triton X-100的PBS(此处称为第2天缓冲液)洗涤两次,与第2天缓冲液中的对应的荧光标记的二抗孵育1小时,用第2天缓冲液洗涤两次,在PBS中洗涤三次,然后固定在载玻片上并盖上盖玻片。用ImageJ分析免疫染色的切片。

[0931] 食蟹猴的PK研究

[0932] 为了评估非人类灵长类动物中抗体的PK并实现人类PK建模,在食蟹猴中进行了PK研究。在第1天和第106天,分别用载体、10、30或100mg/kg的MOR044698处理4组动物,每组3只。分别在给药前、给药后48和168小时获取CSF。给药前和给药后0.5、4、8、24、48、72、96和168小时以及给药后第15、29、43、57、71、85和99天采血。

[0933] 将通过Elisa评估抗体在CSF和血液中的浓度,以及两个隔室中抗体与sTREM2的结合。

[0934] 结果

[0935] 来自初始和备用淘选的抗体的特性

[0936] 在淘选实验之后的筛选努力鉴定了体外以nM亲和力与TREM2的人细胞外结构域结合的抗体(表15)。为了鉴定抗体是否识别TREM2的茎区或IgSF结构域,使用两种不同的TREM2-TREM1嵌合蛋白在ELISA测定中评估抗体。一个构建体含有TREM2 IgSF结构域,接着是TREM1茎区,另一个蛋白质由TREM1 IgSF结构域然后是TREM2茎区进行组装。大多数抗体识别TREM2-IgSF-TREM1茎构建体。MOR041874与TREM2的茎区结合,不识别hTREM2 IgSF-T1茎蛋白。MOR041895仅与全长TREM2结合。

[0937] 抗体还以nM亲和力与CHO细胞中的重组表达的人TREM2结合,并通过THP1-B5细胞中的NFAT启动子活化TREM2依赖性信号传导(表15)。

[0938] 抗体还结合在人M2A巨噬细胞中内源表达的TREM2(表15,最后一栏)。

[0939] 表15.

[0940]

抗体	hTREM2 Fc 直接 Elisa EC_{50} [nM]	Elisa hTREM1 IgSF-T2 茎-hFc-bio	Elisa hTREM2 IgSF-T1 茎-hFc-bio	FACS CHO-DAP12-hTREM2 EC_{50} [nM]	活化 THP1 B5-NFAT 报告基因，活化倍数	与 hM2A（FACS）结合
MOR042492	1.0	否	是	6.1	1.2	是
MOR042493	0.9	否	是	6.8	1.4	是
MOR042495	1.3	否	是	N.D.	N.D.	-
MOR042496	2.5	否	是	9.7	N.D.	-
MOR042497	1.0	否	是	3.8	N.D.	弱
MOR042511	3.2	否	是	7.9	N.D.	
MOR042512	3.0	否	是	8.3	N.D.	
MOR042556	1.7	否	是	8.1	1.5	是
MOR042561	2.9	否	是	3.5	N.D.	
MOR042566	1.8	否	是	3.4	N.D.	

[0941]

MOR042585	1.3	否	是	1.9	N.D.	弱
MOR042588	1.7	否	是	2.5	N.D.	弱
MOR042589	10.9	否	是	4.9	1.8	是
MOR042590	1.6	否	是	4.2	N.D.	弱
MOR042596	2.4	否	是	3.4	1.6	是
MOR042600	0.8	弱	是	4.8	1.7	是
MOR042733	0.6	否	是	N.D.	N.D.	是
MOR042752	1.4	否	是	N.D.	2.1	是
MOR042765	1.6	否	是	N.D.	2.4	是
MOR042778	3.4	否	是	0.4	N.D.	弱
MOR041874	46.1	是	否	0.3		是
MOR041895	16.7	否	否	2.5		

[0942] 为了评估抗TREM2抗体的稳定性特性，用100nM抗体处理CHO-hDAP12-hTREM2细胞约16小时。此后，用FACS分析评估TREM2细胞表面表达。

[0943] 如图2所示，一些IgSF结合物增加TREM2细胞表面表达，这表明ADAM17(例如MOR042492、MOR042493、MOR042556、MOR042589、MOR042596、MOR042752、MOR042765)造成的TREM2脱落受损。

[0944] 在下一步骤中，针对抗体MOR042492和MOR042589移除PTM，并对若干个稳定性抗体进行亲和力成熟。

[0945] 表16.通过SET筛选测定K_D。

[0946]

抗体	K_D [pM]
MOR044743	10585
MOR044741	6886
MOR044742	5699
MOR044744	6801
MOR044746	<600
MOR044698	<600
MOR044724	<600
MOR044722	<600
MOR044700	<600
MOR044701	<600
MOR044703	<600
MOR044747	<600
MOR044695	<600
MOR044728	<600
MOR044734	<600
MOR044737	<600
MOR044738	<600
MOR044739	<600
MOR044729	<600
MOR044730	<600
MOR044731	<600

[0947]

MOR044733	<600
MOR044735	<600
MOR044736	<600
MOR044740	<600
MOR044716	<600
MOR044726	<600
MOR044705	<600
MOR044708	<600
MOR044704	<600
MOR044706	<600
MOR044707	<600
MOR044748	<600
MOR044721	<600
MOR044702	<600
MOR044714	<600
MOR044715	<600
MOR044710	<600
MOR044720	<600
MOR044713	<600
MOR044709	<600
MOR044711	<600
MOR044712	<600
MOR044718	<600
MOR044719	<600
MOR044745	<600
MOR044749	<600
MOR044694	<600
MOR044697	660
MOR044693	<600
MOR044723	<600
MOR044717	<600
MOR044725	<600
MOR044727	<600
MOR044750	<600

[0948] 作为亲和力成熟抗体对人TREM2的结合亲和力的粗略估计,使用hTREM2 ECD(19-174)进行SET筛选实验。在该体外测定中,若干个抗体对重组表达的人TREM2具有亚纳摩尔结合亲和力(表16)。

[0949] 表17.hM2A中抗体的效力和对重组表达的蛋白质和细胞系的选择性。

[0950]

抗体	使用 FACS [nM]在 hM2A 下的 EC_{50}	与亲本 CHO 或缺乏 TREM2（FACS）的 THP-1 的非特异性结合	与 PMA 处理的 hM2A（FACS）结合
MOR044743	<2	是	是
MOR044741	<2	是	是
MOR044742	<2	是	否

[0951]

MOR044744	<2	是	否
MOR044746	<2	否	否
MOR044698	<2	否	否
MOR044724	<2	否	否
MOR044722	<2	否	否
MOR044700	>2	否	否
MOR044701	<2	否	否
MOR044703	>2	否	否
MOR044747	<2	否	否
MOR044695	>2	否	否
MOR044728	<2	否	是
MOR044734	<2	否	否
MOR044737	<2	否	否
MOR044738	<2	否	否
MOR044739	<2	否	否
MOR044729	>2	否	否
MOR044730	<2	否	是
MOR044731	<2	否	否
MOR044733	>2	是	是
MOR044735	>2	否	否
MOR044736	>2	是	否
MOR044740	>2	是	否
MOR044716	<2	否	否
MOR044726	>2	是	否
MOR044705	<2	否	否
MOR044708	<2	否	否
MOR044706	>2	是	否
MOR044707	>2	否	否
MOR044748	>2	否	否
MOR044721	<2	否	否
MOR044702	<2	否	否
MOR044714	>2	是	否
MOR044715	<2	是	否
MOR044710	>2	是	否
MOR044720	<2	否	否
MOR044713	<2	否	否
MOR044709	>2	是	否
MOR044711	>2	是	否
MOR044712	>2	否	否
MOR044718	>2	是	否
MOR044719	>2	是	否
MOR044745	>2	是	否
MOR044749	>2	否	否

[0952]

MOR044694	>2	否	否
MOR044697	<2	否	否
MOR044693	<2	否	否
MOR044723	<2	是	否
MOR044717	>2	否	否
MOR044725	<2	是	否
MOR044727	>2	是	否
MOR044750	>2	是	否

[0953] 接下来使用FACS分析筛选与来自不同供体的hM2A巨噬细胞中内源表达的TREM2的结合的抗体。若干个抗体显示结合EC_{50}低于2nM。此外,大多数抗体不结合亲本(未转染的)CHO细胞或不结合已经进行CRISPR遗传工程改造而没有TREM2表达的THP-1细胞(表17)。

[0954] 表18.测定在源自不同供体的hM2A巨噬细胞中内源表达的人TREM2的细胞EC50。

[0955]

抗体	中值 ±SD [nM]	n	供体 1 [nM]	供体 2 [nM]	供体 3 [nM]	供体 4 [nM]
MOR044746	0.59 ± 0.09	4	0.73	0.54	0.54	0.64
MOR044698	0.56 ± 0.15	4	0.86	0.55	0.55	0.56
MOR044713	0.85 ± 1.79	4	4.38	0.73	0.89	0.80
MOR044716	0.45 ± 0.22	4	0.55	0.08	0.35	0.35
MOR044724	0.28 ± 6.19	4	12.64	0.26	0.20	0.30
MOR044743	0.46 ± 0.19	4	0.46	0.79	0.35	0.46
MOR044741	0.74 ± 0.13	4	0.83	0.81	0.55	0.67
MOR044735	7.63 ± 67.89	4	141.10	8.56	0.68	6.69

[0956] 与重组表达系统相反,人M2A巨噬细胞内源性表达TREM2和DAP12。在该细胞系统中,TREM2蛋白进行翻译后加工,并且与人中的体内情况相比表达非常相似。

[0957] 测定抗体对hM2A巨噬细胞中内源表达的人TREM2的EC_{50}(表18)。n描绘了不同实验的数量,并且在每个实验中,已经从$CD14^+$单核细胞分化的巨噬细胞衍生自不同的供体。结果表明使用FACS分析,大多数抗体对人M2A的具有亚纳摩尔的抗体结合亲和力。给出每个供体的单独值。最出人意料的是,一些抗体(例如44724、44713、44735和44716)显示出在不同供体之间结合亲和力的高度可变性,而其他(例如,MOR044746和MOR44698)则在测试的不同供体之间显示出一致的结合模式。

[0958] 表19.测定抗体识别的TREM2结构域以及与食蟹猴TREM2的结合。

[0959]

抗体	hTREM2 ECD (19-174)-hFc | S/BG	cyTREM2 ECD (19-174)-hFc | S/BG	hTREM1 IgSF-hTREM2 茎 -hFc | S/BG	hTREM2 IgSF-hTREM1 茎 -hFc| S/BG
MOR044743	>5	>5	>30	<11
MOR044741	>5	>5	>30	<11
MOR044742	>5	>5	>30	<11
MOR044744	>5	>5	>30	<11
MOR044746	>5	>5	<2	>20
MOR044698	>5	>5	<2	>20
MOR044724	>5	>5	<2	>20
MOR044722	>5	>5	<2	19
MOR044700	>5	>5	<2	>20
MOR044701	>5	>5	<2	>20
MOR044703	>5	>5	<2	>20
MOR044747	>5	>5	<2	>20
MOR044695	>5	>5	<2	>20
MOR044728	>5	>5	<2	>20
MOR044734	>5	>5	<2	>20
MOR044737	>5	>5	<2	>20
MOR044738	>5	>5	<2	>20
MOR044739	>5	>5	<2	>20
MOR044729	>5	>5	<2	>20
MOR044730	>5	>5	<2	>20
MOR044731	>5	>5	<2	>20
MOR044733	>5	>5	<2	>20
MOR044735	>5	>5	<2	>20
MOR044736	>5	>5	<2	>20
MOR044740	>5	>5	<2	>20
MOR044716	>5	>5	<2	>20
MOR044726	>5	>5	<2	19
MOR044705	>5	>5	<2	11
MOR044708	>5	>5	<2	13
MOR044706	>5	>5	<2	11
MOR044707	>5	>5	<2	17
MOR044748	>5	>5	<2	10
MOR044721	>5	>5	<2	>20
MOR044702	>5	>5	<2	>20
MOR044714	>5	>5	<2	>20
MOR044715	>5	>5	<2	>20

[0960]

MOR044710	>5	>5	<2	>20
MOR044720	>5	>5	<2	20
MOR044713	>5	>5	<2	>20
MOR044709	>5	>5	<2	>20
MOR044711	>5	>5	<2	>20
MOR044712	>5	>5	<2	>20
MOR044718	>5	>5	<2	19
MOR044719	>5	>5	<2	>20
MOR044745	>5	>5	<2	>20
MOR044749	>5	>5	<2	>20
MOR044694	>5	>5	<2	>20
MOR044697	>5	>5	<2	>20
MOR044693	>5	>5	<2	>20
MOR044723	>5	>5	<2	>20
MOR044717	>5	>5	<2	20
MOR044725	>5	>5	<2	19
MOR044727	>5	>5	<2	>20
MOR044750	>5	>5	<2	>20

[0961] 使用重组产生的蛋白质,研究了TREM2的哪个蛋白质结构域(茎区域的IGSF)被抗TREM2抗体识别(表19)。所有抗体以超过5倍的信号:背景比与全长细胞外TREM2构建体结合。抗体MOR044743、MOR044741、MOR0044742和MOR044744与TREM2的茎区强烈相互作用,而大多数其他抗体是IGSF结合物。

[0962] 这些实验还显示这些抗体与食蟹猴TREM2的ECD的交叉反应性(表19)。

[0963] 表20.抗体的物理化学特性的探索性测定。

[0964]

抗体	分析型 SEC（%单体）	pI（计算机模拟预测）	Tm（°C，pH 5.5，IgG 数据）	疏水性（M $(NH_4)_2SO_4$，His pH 6.0）
MOR044743	97.9	9.4	74.0	1.01
MOR044741	98.2	9.4	76.5	1.01
MOR044742	95.1	9.3	73.0	0.84
MOR044744	90.6	9.3	72.5	0.89
MOR044746	95.8	8.6	76.0	0.87
MOR044698	97.9	9.4	75.5	1.03
MOR044724	94.4	7.2	82.5	0.53
MOR044722	95.2	7.2	84.0	0.49

MOR044700	96.4	8.9	77.0	0.87
MOR044701	95.9	9	77.5	0.79
MOR044703	95.6	9	79.5	0.89
MOR044747	94.4	8.9	85.0	0.81
MOR044695	95.3	9.1	71.0	0.55
MOR044728	94.1	8.6	85.0	0.63
MOR044734	94.1	8.9	80.0	0.76
MOR044737	95.3	9.1	81.0	0.75
MOR044738	92.2	8.6	83.0	0.80
MOR044739	94.9	8.9	81.5	0.73
MOR044729	93.2	8.9	81.0	0.76
MOR044730	95.4	8.9	80.0	0.73
MOR044731	97.1	8.6	79.5	0.80
MOR044733	95.5	9.1	79.0	0.81
MOR044735	91.1	8.6	82.0	0.80
MOR044736	94.8	8.9	84.5	0.62
MOR044740	95.1	8.2	79.0	0.49
MOR044716	96.3	8.9	79.0	0.37
MOR044726	92.5	7.5	84.5	0.70
MOR044705	98.0	9.4	71.0	0.95
MOR044708	84.3	9.4	65.0	0.44
[0965] MOR044706	87.7	9.4	69.5	0.78
MOR044707	98.2	9.4	72.5	0.97
MOR044748	95.8	9.4	74.0	0.82
MOR044721	94.0	7.2	83.5	0.59
MOR044702	95.6	9	79.0	0.81
MOR044714	99.2	9.1	83.5	0.21
MOR044715	96.2	9.1	83.0	0.48
MOR044710	98.1	9.2	65.5	0.48
MOR044720	98.5	9	64.0	0.65
MOR044713	97.6	8.7	80.0	0.83
MOR044709	98.6	9.2	82.0	0.54
MOR044711	98.6	9	69.5	0.08
MOR044712	97.7	9.2	65.0	0.19
MOR044718	98.4	9.2	68.5	0.26
MOR044719	99.4	9.3	64.0	0.50
MOR044745	97.3	9.3	77.5	0.56
MOR044749	98.8	9	76.0	0.42
MOR044694	95.9	8.6	76.0	0.84
MOR044697	97.4	9.4	75.0	0.90
MOR044693	95.6	8.6	74.5	0.86
MOR044723	93.6	7.5	82.5	0.44
MOR044717	99.3	9.2	63.0	0.92

MOR044725	94.1	7.8	83.0	0.33
[0966] MOR044727	95.2	7.5	83.0	0.44
MOR044750	93.6	7.8	83.0	0.40

[0967] 为了进一步表征抗体的生物化学和生物物理特性,评估抗体的单体含量、等电点、

解链温度和疏水性(表20)。

[0968] 若干个抗体显示出优异的生物化学和生物物理学特性(即单体含量>94%,pI>7.1,TM>75,并且疏水性>0.4),例如,MOR044746、MOR044698、MOR044724、MOR044722、MOR044716、MOR044705、MOR044713。

[0969] 表21.经由SPR通过无标记动力学测定K_D。

[0970]

抗体	hTREM2 ECD (19-174)-hFc [pM]	cyTREM2 ECD (19-174)-APP-Avi) [pM]
MOR044746	3	4
MOR044698	46	39
MOR044713	11	4
MOR044716	150	100
MOR044724	85	130

[0971] 为了精确评估抗体的结合亲和力,通过SPR进行通过测量动力学速率常数的亲和力测定。此外,进行与食蟹猴TREM2的比较(表21)。在进行这些实验之前,分析抗体蛋白(IgG)的单体级分的量(通过分析型SEC至少90%单体含量)。

[0972] 抗体对重组表达的食蟹猴或人TREM2 ECD结构域的K_D的测定揭示了pM亲和力。人和食蟹猴TREM2相比,这些亲和力相似。

[0973] 为了进一步评估TREM2抗体的特异性,用PMA处理人M2A巨噬细胞,并使用FACS分析评估抗体与这些巨噬细胞的结合(图3)。已显示PMA活化蛋白酶例如ADAM17,导致从TREM2 ECD从hM2A脱落(Feuerbach,D等人Neurosci Lett[神经科学通讯],2017.92:p.202-209)。在PMA处理后,AF1828 Ab不再与M2A巨噬细胞结合(比较第一和第二柱条)。

[0974] 然而,若干个抗体(例如MOR44728、MOR46021、MOR46022、MOR46023、MOR46025、MOR46026、MOR46028、MOR46029和MOR46030)仍然结合人M2A巨噬细胞的细胞表面上的结构,这表明非特异性结合。在PMA处理后,若干个抗体(例如MOR44694、MOR44698、MOR44705、MOR44746)缺乏与人M2A巨噬细胞的结合。

[0975] 为了进一步研究抗体的非靶标相关结合特性,对选定的一组抗体进行蛋白质组谱分析。结果显示抗体的累积结合比率低于150,这代表IgG没有可检测的非特异性结合(表22)。

[0976] 表22.蛋白质组谱分析(3P)中非特异性结合的测定。

[0977]

抗体	累积结合比率
MOR044746	<150
MOR044698	<150
MOR044713	<150
MOR044716	<150
MOR044724	<150
MOR044743	<150

[0978] 重组表达嵌合TREM2-TREM1构建体的CHO细胞用于鉴定TREM2蛋白内抗体的结合位点。使用FACS分析,证明所有抗体与全长WT-人TREM2结合(图4A)。抗体MOR044698、MOR044713、MOR044716、MOR044724和MOR044746与表达TREM2-IgSF-TREM1茎蛋白的细胞系(图4B)结合,但不与表达TREM1-IgSF-TREM2茎蛋白的细胞系(图4C)结合。抗体MOR44743和

MOR041874显示出相反结合模式,即这些抗体与表达TREM1-IgSF-TREM2茎蛋白的细胞系结合但不与表达TREM2-IgSF-TREM1茎蛋白的细胞系结合。MOR3207是同种型对照抗体,抗人仅是二级FACS染色抗体。

[0979] 在下一组实验中,评估了使用重组细胞表达系统的抗体效力。使用FACS分析测定抗体对重组表达食蟹猴或人TREM2的CHO细胞的EC_{50}(表23)。在表达人TREM2的CHO细胞中,显示抗体展示亚纳摩尔结合亲和力。在表达食蟹猴TREM2的细胞系中,与表达人TREM2的细胞相比,结合亲和力在相似的范围内。

[0980] 表23.使用FACS分析测定表达CHO-cynoTREM2和CHO-人TREM2的细胞系的细胞EC_{50}。

[0981]

抗体	CHO-hTREM2 [nM]	CHO-cyTREM2 [nM]
MOR044746	0.16	0.65
MOR044698	0.20	0.46
MOR044713	0.26	0.71
MOR044716	0.24	0.63
MOR044724	0.13	0.31

[0982] 用100nM抗TREM2抗体对来自不同供体的hM2A进行过夜处理。接下来,使用非交叉封闭Fab片段MOR041895评估细胞表面的TREM2表达。与抗体MOR044741、MOR044743相对比,与抗体MOR044746、MOR044698、MOR044713、MOR044716和MOR044724一起孵育导致细胞表面的TREM2稳定化。所有抗体显示亚纳摩尔亲和力和对TREM2的相似Bmax(如之前所确定的)。然而,MOR044746、MOR044698、MOR044713、MOR044716和MOR044724与IgSF结构域结合,而MOR044741和MOR044743与TREM2的茎区结合(图5)。表24显示TREM2细胞表面表达与同种型对照(MOR03207)相关的倍数增加。n表示不同实验的数量,并且在每个实验中,巨噬细胞衍生自不同的供体。

[0983] 这些数据表明,与TREM2的IgSF结构域结合的抗体抑制脱落酶如ADAM17导致的胞外域释放并增加TREM2的细胞表面表达。

[0984] 表24.抗TREM2抗体对hM2A中细胞表面TREM2的稳定化的定量。

[0985]

抗体	与同种型相比,细胞表面 TREM2 增加倍数	n
MOR044746	5.1	3
MOR044698	7.9	3
MOR044713	3.9	3
MOR044716	2.9	3
MOR044724	4.2	3
MOR044741	0.7	2
MOR044743	0.8	2

[0986] 来自不同供体的hM2A用100nM(图6A)或10nM(图6B)的抗TREM2抗体处理。16-20小时后,使用pHrodo标记的金黄色葡萄球菌生物颗粒作为捕获物对细胞进行吞噬作用测定。稳定TREM2细胞表面表达的抗体(MOR044746、MOR044698、MOR044713、MOR044716和MOR044724)促进hM2A的吞噬作用。相反,不增加细胞表面表达的MOR044741和MOR044743也不增强pHrodo金黄色葡萄球菌生物颗粒的摄取。抗体MOR044746、MOR044698、MOR044713、MOR044716和MOR044724以10nM在吞噬作用测定中也是有效的(图6B)。这些数据表明结合

TREM2的IgSF结构域的抗体增加了hM2A的吞噬能力。

[0987] 接下来,将不同浓度的稳定TREM2的抗体与hM2A巨噬细胞一起孵育,然后在16-20小时后进行吞噬作用测定。与同种型对照相比,抗体44698和44716在两个供体中甚至在测试的最低浓度(1nM)处增强了pHrodo金黄色葡萄球菌生物颗粒摄取进入hM2A。抗体44746和44713的最低活性浓度也是1nM,但仅对一个供体。44694的最低活性浓度为3nM,但也仅对一个供体(图7A,7B)。

[0988] 图8显示抗体对THP1-B5细胞中内源表达的TREM2的活化诱导NFAT启动子驱动的萤光素酶活性。用同种型对照或不同的抗TREM2抗体包被板。抗体MOR044746、MOR044698、MOR044713、MOR044716和MOR044724活化TREM2依赖性基因转录。

[0989] 图9(A,B)显示在用同种型对照抗体(MOR03207或ratIC)或抗TREM2抗体(MOR044698或rathT2)处理后,通过来自人M2A巨噬细胞的蛋白质印迹测定的Syk磷酸化。在指出的情况下(X-交联:+),然后用抗-Fc交联抗体(x-交联)处理。

[0990] 如图9A中所示,TREM2抗体44698增加人M2A巨噬细胞中TREM2诱发的Syk磷酸化。MOR044698以及市售的R&D大鼠抗人TREM2抗体即使在不存在抗Fc交联抗体的情况下也增强syk磷酸化(图9A中比较泳道1与2和泳道5与6)。添加交联抗体后,这种效果大大增强(比较泳道3与4和泳道7与8)。添加交联抗体MOR044698后,与大鼠抗人TREM2抗体相比,观察到对syk磷酸化的更强作用(参见泳道4和8)。

[0991] 这些实验表明,在具有内源性TREM2表达的人细胞系统中,Ab MOR044698显示—与稳定TREM2的活性同时地—TREM2激动活性。

[0992] 在下一组实验中,评估高分子量物质、低分子量物质的存在以及纯化的抗体的纯度(表25)。使用尺寸排阻色谱(SEC)分离天然条件下大小不同的单克隆抗体变异体。短期聚集由低分子量物质(LMW)的形成表示。短期聚集通过低分子量物质(LMW)的形成来表示。高分子量物质(HMW)通过尺寸排阻色谱(SEC)和使用十二烷基硫酸钠(CE-SDS)的毛细管凝胶电泳测量,并且表明抗体形成聚集体的倾向,由于免疫原性等原因不需要聚集体。高分子量物质(HMW)表示纯化的材料的不需要的特性。使用十二烷基硫酸钠(CE-SDS)的毛细管凝胶电泳基于分子量的差异分离蛋白质,并且可以在非还原或还原条件下进行。降解产物、低分子量物质(LMW)(包括剪切)和副产物(HMW)的含量表明纯化的材料的质量。如下所示,所有分子在可开发性方面显示出有利的质量属性。

[0993] 表25.最终分析特征:纯化的抗体的纯度和高/低分子量物质。

[0994]

抗体	HMW (%, SEC)	LMW (%, SEC)	LMW* (%, 还原 CE-SDS Beckman)	纯度 (%, 还原 CE-SDS Beckman)	LMW** (%, 非还原 CE-SDS Beckman)	纯度 (%, 非还原 CE-SDS Beckman)
MOR044698D	0.0	0.1	1.1	98.4	3.5	96.5
MOR044746D	0.1	0.0	2.9	95.9	3.6	96.4
MOR044698E	0.1	0.2	1.0	98.4	3.6	96.4
MOR044746E	0.8	0.0	2.8	96.2	3.0	97.0
MOR044698 B	0.0	0.1	1.1	98.0	3.5	96.5
MOR044746B	0.2	0.0	2.6	96.3	3.4	96.6
MOR044698C	0.0	0.1	1.2	98.0	3.7	96.3
MOR044746C	0.2	0.0	2.8	96.4	3.6	96.4
MOR044698F	0.0	0.1	1.2	98.0	3.9	96.1
MOR044746F	0.1	0.0	2.9	95.9	3.2	96.8

[0995] 注释:

[0996] *还原型CE-SDS:报告的LMW包括潜在的非糖基化HC。

[0997] **非还原型CE-SDS:报告的LMW包括潜在的抗体片段。

[0998] 在进一步的实验中,研究了纯化的抗体的分子量、糖化、糖基化、剪切产物和序列变体(表26)。蛋白质糖化是还原糖(例如葡萄糖、半乳糖和果糖)与蛋白质胺基团之间的非酶促糖基化。对于治疗性蛋白质,糖化的潜在影响包括封闭生物功能位点或进一步降解,该降解诱导聚集。糖基化作为蛋白质翻译后修饰的常见形式,是多种酶介导的过程,通过该过程,寡糖侧链共价连接至天冬酰胺(N-连接)或丝氨酸/苏氨酸(O-连接)的侧链。治疗性糖蛋白的碳水化合物组分通常是决定其药理学特性(包括稳定性、溶解度/生物利用度、体内活性、药代动力学和免疫原性)的关键。剪切(片段化)是重组治疗性蛋白质的常见类型的生物化学降解。它通常与宿主细胞系中的蛋白酶活性相关,并且对蛋白质药物的质量、物理稳定性和潜在的免疫原性具有影响。如下所示,所有分子在可开发性方面显示出有利的MS谱。

[0999] 表26.最终分析特征:纯化的抗体的抗体质量、糖化、糖基化剪切和序列变体。

[1000]

抗体	质量符合（HC，LC）	糖化 LC [%]	N-糖基化	CDR 剪切 [%]	其他剪切[%]	序列变体
MOR044698D	是	≤2	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044746D	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044698E	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044746E	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044698 B	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044746B	是	≤2	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044698C	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044746C	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044698F	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD
MOR044746F	是	3	正常复合物	<LOD	<LOD	<LOD

[1001] HC:重链

[1002] LC:轻链

[1003] LOD:检测限

[1004] 下一组实验评估了纯化的抗体的生物物理特性(即差异相互作用参数、粘度、疏水性、解链温度和等电点)(表27)。差异相互作用参数(DIP)是胶体稳定性的量度,其是分子由于与疏水性表面残基等相关的弱吸引力而缔合的倾向。它可以与分子的粘度相关。粘度是由于内部摩擦力引起的流动阻力,其在流体运动时发生。它对分子的可开发性和施用具有强烈影响。测量蛋白质表面疏水性的直接方法是确定其在用硫酸铵洗脱期间的保留时间。疏水性是浓缩过程中蛋白质聚集和不利影响的关键风险因素。差示扫描荧光法(DSF)通过应用增加的温度梯度确定蛋白质的转变解折叠温度。热稳定性(通过差示扫描荧光法DSF在pH 5.5下测量的解链温度Tm)是蛋白质随温度通常因为疏水核心的暴露而聚集和/或解折叠的倾向。热诱导的解折叠是典型的双态模型,其在折叠状态和解折叠状态之间具有急剧过渡,其中Tm值被定义为蛋白质解折叠转变的温度的中点。报道了Fab的Tm,它是分子热稳

定性的指标。解折叠的起始点是分子热稳定性的另一个指标,决定了蛋白质开始解折叠的温度。等电点(pI)是抗体没有净电荷时的pH,其值取决于抗体含有的带电氨基酸。它对分子的纯化过程有影响。已知mAb的pI对PK行为具有实质性影响,而与新生儿Fc受体FcRn介导的再循环无关。pI值在8-9范围内的治疗性抗体在施用后充分摄取,因为生理pH为7.4。如下所示,所有分子在可开发性方面显示出有利的生物物理特性。

[1005] 表27.最终分析特征:纯化的抗体的生物物理特性。

[1006]

抗体	DIP [mL/g]	在 50 mg/mL 处的粘度 (cP)	HIC [M] $(NH_4)_2SO_4$, pH6.0	通过 DSF 在 pH 5.5 处的 Tm [°C]	解折叠开始 (°C, DSF)	pI (计算机模拟)
MOR044698D	22	1.51	1.02	75	56	9.4
MOR044746D	5	1.48	0.86	76	58	8.6
MOR044698E	20	1.43	1.02	75	54	9.5
MOR044746E	8	1.45	0.86	75	57	8.9
MOR044698 B	28	1.43	1.04	76	58	9.4
MOR044746B	8	1.46	0.88	75	57	8.6
MOR044698C	20	1.49	1.05	76	55	9.5
MOR044746C	7	1.51	0.88	75	54	8.9
MOR044698F	13	1.44	1.02	76	51	9.3
MOR044746F	18	1.43	0.86	75	51	8.2

[1007] 在人质膜蛋白结合细胞阵列上分析抗TREM2抗体谱以测试它们的选择性(表28)。MOR044716与表达TYRO3、SEZ6L2和TGM2的细胞结合。MOR044716对未转染细胞的背景信号可能与这些脱靶之一的内源表达有关。与SEZL2和TGM2相反,TYRO3经常在Retrogenix筛选中被鉴定,并被认为是该平台上的“粘性”受体。然而,信号强度(弱/中)足以将其视为潜在的特定脱靶。MOR044724与表达CD36和CRHBP的细胞结合。

[1008] TREM2是MOR044746、MOR044698和MOR044713的唯一特异性靶标,表明这些抗体的高水平的选择性。除了它们的主要靶标,MOR044716和MOR044724还分别识别3个和2个相关的脱靶。

[1009] 表28.使用人质膜蛋白细胞阵列进行TREM2抗体的结合谱评估。

[1010]

命中	登录号	测试分子				
		MOR044746	MOR044698	MOR044713	MOR044716	MOR044724
TREM2 (同种型 3)	BC032362	强	强	强	培养基	中/强
TYRO3	NM_006293.3				弱/中	
SEZ6L2	BC000567.2				弱/中	
CD36	BC008406					弱/中
TGM2	NM_004613.2				弱	
CRHBP	BC018038.1					弱/中

[1011] 用抗TREM2抗体预处理后,使用独立于FACS分析的技术在人M2A巨噬细胞中进行吞噬作用实验(图10)。另外,使用两种不同的同种型对照抗体(MOR3207和ACE27716)以及市售的TREM2抗血清(TREM2R&D)。与基于FACS的吞噬作用测定相反,吞噬作用进行经3小时的时间,并针对细胞内pHrodo生物颗粒积累评估曲线下面积。与hIgG同种型对照抗体相比,MOR044746和MOR044698显示出吞噬作用的统计学显著的促进作用。

[1012] 已证实使用市售的pHrodo标记的金黄色葡萄球菌为捕获物时hM2A巨噬细胞中的

吞噬作用的促进(参见图6、7和10)。磷脂酰丝氨酸已被描述为与TREM2结合的配体(Kober,C和Bret,TJ J Mol Biol[分子生物学杂志],2017.429(11):第1607-1629页)并在凋亡细胞中的质膜上暴露。此外,体内TREM2似乎参与去除细胞碎片。因此,凋亡的SH-SY5Y细胞用pH敏感染料pHrodo标记并用作吞噬细胞捕获物(图11)。类似于用pHrodo标记的金黄色葡萄球菌获得的结果。与两种同种型对照抗体MOR03207和ACE27716相比,金黄色葡萄球菌与抗TREM2抗体MOR044698和MOR044746预孵育在3-12小时的时间内增加了M2A巨噬细胞的吞噬能力。

[1013] 总之,图6、7、10和11表明,当使用两种不同的捕获物和两种不同的实验读数时,抗TREM2抗体MOR044698和MOR044746增加M2A巨噬细胞的吞噬能力。

[1014] 已显示TREM2参与破骨细胞的趋化应答(Humphrey等人J Bone Min Res[骨矿物质研究杂志],2006.21:237-245.201(4):第647-657页)。因此,在人M2a巨噬细胞中评估抗TREM2抗体对趋化应答的影响。使用20ng/ml的化学引诱物C5a与100nM MOR044698或MOR044746组合,观察到与两种同种型对照抗体MOR03207和ACE27716相比的趋化性的统计学显著增强(参见图12)。

[1015] 该实验显示MOR044698和MOR044746在人M2A巨噬细胞中对第二TREM2依赖性生理细胞读数(趋化性)显示功效。

[1016] 类似地,对于用人M2A巨噬细胞获得的结果,与两种同种型对照抗体MOR03207和ACE27716相比,人iPS衍生的小胶质细胞样细胞与抗TREM2抗体MOR044698和MOR044746的预孵育在20小时的时间内增加了pHrodo标记的凋亡SH-SY5Y细胞的吞噬能力(参见图13)。

[1017] 已显示TREM2参与小胶质细胞的趋化应答(Takahashi,K等人JExp Med[实验医学杂志],2005.201(4):第647-657页)。因此,在人iPS衍生的小胶质细胞样细胞中评估抗TREM2抗体对趋化应答的影响。使用20ng/ml的化学引诱物C5a与100nM MOR044698或MOR044746组合,观察到与两种同种型对照抗体MOR03207和ACE27716相比的趋化性的统计学显著增强(参见图14)。

[1018] 这些实验表明,MOR044698或MOR044746增加了另一种人源细胞系统(小胶质细胞)的吞噬功效和第二TREM2依赖性生理细胞读数(趋化性)。

[1019] 人源化TREM2 Crispr敲入小鼠的铜宗模型

[1020] 铜宗模型中鼠源化MOR44698 TREM2抗体的预防/伴随治疗

[1021] 如图15A所示,Luxol快蓝没有检测到胼胝体(corpus callosum,CC)中髓磷脂的差异。这与MRI(图15B)一致,MRI在CC中的MTR中也没有显示出明显差异。针对小胶质细胞标志物Iba1的定量免疫组织学分析在44698处理的小鼠内的CC中显示出比同种型处理减少的数量(图15C)和降低的活化状态(图15D)。这与MRI一致,MRI在CC中观察到降低的MRI强度(图15E)。

[1022] 铜宗模型中鼠源化MOR44698 TREM2抗体的治疗性治疗

[1023] 如图15A所示,与3207相比,Luxol快蓝检测到CC中髓鞘的显著增加。这与MRI一致,MRI也显示出在44698处理的情况下,CC中MTR增加(图15B)。针对小胶质细胞标志物Iba1的定量免疫组织学分析显示,与同种型对照相比,44698处理的小鼠中CC的数量(图15C)和活化状态(图15D)没有差异。这与MRI一致,MRI观察到CC中的MRI强度在治疗组之间没有变化(图15E)。

[1024] 这些数据表明,如果治疗地给予44698抗TREM2抗体,其对髓鞘形成过程具有有益作用,并改变小胶质细胞数量和活化,这意味着TREM2抗体在以下疾病中具有潜在的治疗益处,所述疾病为任何发生脱髓鞘或预期在中枢或周围神经系统中发生髓鞘再生的疾病,包括但不限于:多发性硬化,包括临床孤立综合征、原发进展性MS、复发缓解性MS、马尔堡多发性硬化和继发进展性MS、林巴利综合征及其慢性对应征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、抗MAG周围神经病变、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth disease)及其对应的遗传性压迫易感性神经病、与维生素B12缺乏症相关的神经病、巴洛同心性硬化、希尔德弥漫性硬化症(Schilder's diffuse sclerosis)、和德维克病(Devic'sdisease)、脑桥中央髓鞘溶解症、脊髓病如脊髓痨(梅毒性脊髓病)、脑白质病例如进行性多灶性白质脑病(由JC病毒活化引起)、脑白质营养不良、视神经炎、横贯性脊髓炎、视神经脊髓炎、铜缺乏相关疾病(周围神经病变、脊髓病和视神经病变)、进行性炎症性周围神经病变、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)和其他归纳于炎症性脱髓鞘疾病术语下的具有免疫系统损害的疾病。

[1025] 人源化TREM2 Crispr敲入小鼠的MPTP模型

[1026] MPTP处理后7天,处死动物并在冠状脑自由漂浮切片上进行免疫荧光。酪氨酸羟化酶(TH)用抗体染色,显微拍照,纹状体的染色面积用Fiji软件定量。TH由多巴胺能神经元特异性表达,并且在它们死亡后可以在位于黑质中的多巴胺能细胞以其长轴突突出到的纹状体中观察到TH减少。

[1027] 如图16A所示,与原初动物(未经处理的对照野生型)相比,经MPTP和同种型对照3207处理的动物显示出明显降低的纹状体TH阳性染色(%面积),而44698处理的小鼠比同种型对照处理的动物显示出实质上更多的TH染色。在图16B中是来自不同处理组的纹状体的代表性显微荧光图片(放大倍数10x)。

[1028] 该数据表明了TREM2抗体潜在的神经保护作用,暗示其针对神经退行性疾病的普遍的潜在益处,所述疾病包括但不限于:帕金森病、多系统萎缩、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、和路易体痴呆(DLB)、突触核蛋白病、tau病、威尔逊氏病、脑铁积聚神经退行性疾病、特发性基底神经节钙化、额颞叶痴呆和与17号染色体相关的帕金森病、脆性X相关性震颤/共济失调综合征、缺血性中风、出血性中风、短暂性脑缺血发作、肌萎缩侧索硬化(ALS)、又称运动神经元疾病(MND)或Lou Gehrig病、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓麻痹、假性延髓麻痹、和单一性肌萎缩(MMA)、额颞叶痴呆(FTD)、FTD行为变异、语义变异原发性进行性失语、非流利的语法失能变异原发进行性失语、皮质基底综合征、进行性核上性麻痹、和与运动神经元病相关的FTD、皮克氏病、额颞叶变性、酒精性痴呆、血管性痴呆、皮质基底节变性和克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)。

[1029] 实例3:交叉封闭实验

[1030] 材料和方法

[1031] 使用CHO-hDAP12-hTREM2细胞评估Fab MOR041877或Fab MOR041895或Fab MOR042596与全IgG MOR041877(IgSF结合物)、MOR41895(需要茎和IgSF来结合)、MOR042596(IgSF结合物和MOR044698的亲本)、MOR044698和MOR03207(同种型对照)的交叉封闭活性。将CHO-hDAP12-hTREM2细胞在补充有5μM DPC333的培养基中培养过夜以增加TREM2的细胞表面表达。第二天,将CHO-hDAP12-hTREM2细胞用accutase分离,使用PBS洗涤一次,并以4×

10^6个细胞/ml的浓度重悬浮于FACS缓冲液(PBS,2% FBS,0.5mM EDTA,pH 8.0)中。根据来自英杰公司(Invitrogen)的制造商的方案MAN0006869,用Alexa Fluor 647(AF647)标记Fab片段MOR041877、MOR041895和MOR042596。将100nM全IgG抗体与15μl的细胞悬浮液混合于30μl的总体积中,并在冰上孵育30分钟。将细胞用PBS洗涤一次,并与AF647标记的100nM Fab片段在冰上孵育30分钟,用PBS洗涤两次,用细胞固定缓冲液(Biolegend公司)固定,并重悬浮于FACS缓冲液中。在BD FACS canto仪器上进行采集。

[1032] 结果

[1033] Fab片段MOR041877的结合不受与MOR041895预孵育的影响(图17A),因为其与使用同种型对照MOR03207预孵育或不进行任何预处理(最后一栏)获得了类似的信号。与MOR042596和MOR044698的预孵育强烈降低了Fab MOR041877的结合,显示了这三种抗体具有重叠的表位。通过与衍生自该Fab的全IgG预孵育,Fab MOR41895的结合降低,但通过与MOR041877、MOR044698或MOR042596预孵育,其结合未降低。全IgG MOR041877、MOR044698和MOR042596与TREM2的结合似乎促进了Fab41895的接近,从而导致信号强度增加(图17B)。最后,全IgG MOR041877、MOR044698或MOR042596的预结合完全抑制了Fab MOR042596随后的结合,表明MOR041877和MOR044698与MOR042596共享相同的表位(图17C)。总体而言,这些实验表明,亲和力成熟的MOR044698与亲本抗体MOR042596结合相同的表位。

[1034] 实例4:MOR041877和MOR042596的表征

[1035] 抗体MOR041877和MOR042596与在CHO-hDAP12-hTREM2细胞中重组表达的人TREM2结合,也与在人M2A巨噬细胞中表达的TREM2结合,并激活THP-B5细胞中TREM2依赖性报告基因活性(参见表29)。这些数据表明两种抗体均显示出对TREM2的高亲合力并直接活化TREM2。

[1036] 表29.MOR041877和MOR042596在不同细胞系统中的表征。

[1037]

测定	MOR041877	MOR042596
CHO-hDAP12-hTREM2的FACS(EC_{50},nM)	0.5	3.4
hM2A中的FACS(EC_{50},nM)	0.7	37
THP-B5细胞中的RGA(相比于BG增加倍数)	2.1	1.8

[1038] 另外,用100nM抗TREM2抗体MOR042596或同种型对照(MOR03207)处理hM2A巨噬细胞。16-20小时后,使用不同浓度的pHrodo标记的金黄色葡萄球菌作为吞噬性捕获物,对细胞进行吞噬作用测定。在使用的金黄色葡萄球菌的整个浓度范围内,MOR042596显著增强了hM2A巨噬细胞的吞噬能力(图18)。这表明MOR042596增加了M2A巨噬细胞中的TREM2信号传导和TREM2依赖性效应子功能。

[1039] 实例5:人TREM2/MOR042596Fab复合物的X射线晶体结构

[1040] 测定人TREM2(SEQ ID NO:1的残基19-174,其后是His-tag;SEQ ID NO:139)与MOR042596的Fab片段(SEQ ID NO:15的残基1-222,和SEQ ID NO:82位残基1-214)结合的晶体结构。如下所述,使用单独的表达系统制备复合物的个体组分,并将其组合以产生纯化的复合物。然后使用X射线晶体学获得TREM2与MOR042596结合的衍射数据,这阐明了抗原结合位点。

[1041] SEQ ID NO.139

[1042] HNTTVFQGVA GQSLQVSCPY DSMKHWGRRK AWCRQLGEKG PCQRVVSTHN LWLLSFLRRW NGSTAITDDT LGGTLTITLR NLQPHDAGLY QCQSLHGSEA DTLRKVLVEV LADPLDHRDA GDLWFPGESE SFEDAHVEHS ISRSLLEGEI PFPPTSHHHH HH

[1043] 蛋白质产生

[1044] 通过大规模瞬时转染在哺乳动物细胞中表达人TREM-2(SEQ ID NO:1的残基19-174,其后是His-tag;SEQ ID NO:139)。简单地说,将质粒DNA与聚乙烯胺(PEI 25k,波利塞斯公司(PolyScience))以1:2混合,并使其形成胶束复合物持续30分钟。起始接种培养物含有2mg DNA和4mg PEI/1L培养物。通过将这些混合物以2μg DNA:3×10^6个细胞的比例添加到HEK 293-6E细胞(英杰公司)中来实现转染。在37℃和5% CO_2下在开口烧瓶中振荡,使细胞在V3培养基(生物概念公司(Bioconcept Ltd.)Amimed)中生长。转染后130h收集培养上清液,通过添加50mM Tris pH 8.5、300mM NaCl、5%甘油和10mM咪唑进行修饰,然后使用NiNTA-亲和层析进行纯化。使用包含20mM咪唑的相同缓冲液在柱上洗涤蛋白质,并在250mM咪唑中洗脱。通过尺寸排阻色谱(superdex 75),用含有50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、10%甘油的缓冲液,对TREM2进行进一步纯化。通过SDS-PAGE测定,所得蛋白质的纯度>90%。

[1045] 为了制备MOR042596,用编码二硫键桥连FabCys的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HEK293-T细胞。在转染后第7天收获细胞培养物上清液,并进行CH1亲和色谱(Capture Select IgG-CH1,赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))。将缓冲液交换至20mM Tris、100mM NaCl pH 7.5,并对样品进行无菌过滤(0.2μm孔径)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用SDS-PAGE在变性、还原和非还原条件下分析FabCys的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的FabCys制剂。

[1046] TREM2-MOR042596Fab复合物的体外重组

[1047] 然后将纯化的TREM2与MOR042596Fab以1:1的摩尔比(浓度通过OD A280测量)混合。然后将所述复合物浓缩,接着上样到用50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、5%甘油平衡的Superdex 75柱(GE医疗集团生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))上。通过SDS-PAGE对峰级分进行分析,并将选定的级分合并进行结晶试验。

[1048] 结晶和结构确定

[1049] 将TREM2-MOR042596Fab复合物浓缩至7.5mg/ml,然后在执行结晶筛选之前以20,000×g离心10分钟。使用坐滴蒸汽扩散装置在20℃下使晶体生长。将0.2μl TREM2-MOR42596复合物与0.2μl含20%PEG3350、0.2M酒石酸钾钠的储液混合,并将液滴针对80μl储液进行平衡。用20%甘油作为冻存保护剂从母液中收获晶体,并在液氮中直接快速冷冻。

[1050] 在瑞士同步辐射光源(Swiss Light Source)光束线X10SA(Villigen,瑞士)下,使用PILATUS 6M检测器在1.000Å波长收集数据集。在APRV程序套件中(Kroemer M,Dreyer MK,Wendt KU 2004.APRV-a program for automated data processing,refinement and visualization[APRV-用于自动数据处理、细化和可视化的程序].Acta Cryst.[晶体学报]D60:1679-82),分别使用XDS和XSCALE对在0.25°振荡角楔形处记录的衍射图像进行处理和缩放(Kabsch W,1993.Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants[自动处理来自最初未知的对称性和晶胞常数的晶体的旋转衍射数据]J.Appl.Cryst.[应用晶体学杂志]26:795-800)。通过使用移相器(McCoy AJ,Grosse-Kunstleve RW,Adams PD等人2007.Phaser

crystallographic software.[移相器晶体学软件]J.Appl.Cryst.[应用晶体学杂志]40:658-74)的分子置换并且以Fab和TREM2 Ig结构域的同源性模型作为搜索模型来获得初始结构。在Coot(Emsley P,Cowtan K(2004)Coot:model-building tools for molecular graphics.[Coot:用于分子图形的模型构建工具]Acta Cryst.[晶体学报]D60:2126-32.)和autoBuster(Bricogne G,Blanc E,Brandl M等人(2009)BUSTER,版本2.8.0.剑桥,英国,全相公司(Global Phasing Ltd.))中分别进行模型的手动重建和随后的结构细化。

[1051] hTREM2上的MOR042596结合表位的阐释

[1052] 如上所述,我们获得了人TREM2/MOR042596Fab复合物的X射线共晶体结构。图19显示了TREM2残基与MOR042596相互作用的概况。

[1053] 从TREM2/MOR042596-Fab复杂结构中,我们推导了TREM2表位,其涵盖了huTREM上的三个单独的序列区域,如表30所给出。所有hTREM2同种型(SEQ ID NO.1-3)共有前161个残基,它包含信号肽和整个IgSF结构域;因此,如下所示(例如表30、31和33),所有这三种hTREM2同工型的表位和残基编号在该范围(即,直至并且包括残基R161)内都相同。

[1054] 表30.结合MOR042596的TREM2表位

[1055]

hTREM2上的序列段	残基
1区	D39-S40-M41-K42;W44-G45-R46
2区	W70-L71-L72;F74
3区	T88-L89-G90

[1056] MOR044698和MOR042596之间的相似性以及结合MOR044698的hTREM2表位

[1057] 如图19所示,hTREM2与MOR042596的重链和轻链均相互作用。紧密相关的Fab MOR044698与MOR042596在六个TREM2结合环中的五个(即HCDR1、HCDR2、HCDR2、LCDR1和LCDR2)中享有相同的序列,而仅LCDR3不同。表31给出了这些环的序列以及TREM2/MOR042596Fab复合物结构中5 Å距离内的TREM2残基,表32给出了MOR042596和MOR044698的LCDR3序列的比较。

[1058] 表31.MOR042596的HCDR和LCDR序列以及5 Å内TREM2上的相互作用残基。

[1059]

CDR	序列	SEQ ID NO	5Å 内 hTREM2 上的相互作用残基
HCDR1	GYTFTGYHMS	4	W44 ; W70-L71 ; T88-L89
HCDR2	VINPVSGNTVYAQKFQG	5	W44 ; L71-L72 ; F74 ; L89-G90
HCDR3	IPSYTYAFDY	6	M41 ; W44-G45 ; W70-L71

[1060]

LCDR1	RASQDISNYLA	17	M41-K42; R46
LCDR2	RASSLQS	18	R46
LCDR3	QQHGHSPTT	78	D39-S40-M41-K42

[1061] 表32.MOR042596和MOR044698的LCDR3序列。

[1062]

候选物 ID	LCDR3									
MOR044698	F	Q	Y	R	H	M	P	S	Q	T
MOR042596	Q	Q	H	G	H	S	P	-	T	T
序列编号 (卡巴特)	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97

[1063] 为了评估两个Fab之间LCDR3差异的结构含义,我们建立了MOR044698的同源性模型。我们使用MOR042596的晶体结构作为模板,并使用CCG MOE版本2018.01作为建模软件在

标准设置下[Molecular Operating Environment[分子操作环境](MOE),2018.01;化学计算集团(Chemical Computing Group)ULC:蒙特利尔,QC,加拿大,2018]构建模型。图20显示了两个Fab与TREM2的交界处。在HCDR1-3和LCDR1-2相同的情况下,唯一要讨论的差异在于LCDR3。从表32可以得出,有若干个保守的残基(例如Pro95,其对LCDR3环的构象有决定性影响)。在TREM2和两个Fab的交界处,MOR042596和MOR044698相比,存在三个位置发生重要变化/突变:第92位甘氨酸变为精氨酸,第94位丝氨酸变为甲硫氨酸,并在MOR044698的位置95a插入了丝氨酸。丝氨酸95a的插入不会引起主要的构象变化,而只会引起蛋白质骨架的轻微改变。剩余的位置92和94上两个主要氨基酸变化(代表侧链的主要变化)可以被构建到LCDR3预先存在的环结构中(如在MOR042596晶体结构中所观察到的),而不会导致与TREM2发生任何碰撞或不利的接触。在位置89、91和96还有其他差异。位置89和96不参与与TREM2的任何接触,位置91的组氨酸-酪氨酸突变仅容许侧链构象的少量改变。总的来说,在LCDR1和LCDR2和LCDR3(其显得具有不变的环构象,并且与MOR044698中的TREM2具有保守的接触)中的重链相同、轻链相同情况下,我们因此得出结论,两个Fabs MOR042596和MOR044698之间的TREM2表位相同。

[1064] 人TREM2/MOR041877Fab复合物的X射线晶体结构

[1065] 测定人TREM2(SEQ ID NO:1的残基19-174,其后是His-tag;SEQ ID NO:139)与MOR041877的Fab片段(SEQ ID NO:95的残基1-224,和SEQ ID NO:106位残基1-216)结合的晶体结构。如下所述,使用单独的表达系统制备复合物的个体组分,并将其组合以产生纯化的复合物。然后使用X射线晶体学获得TREM2与MOR041877结合的衍射数据,这阐明了抗原结合位点。

[1066] 蛋白质产生

[1067] 如上文对MOR042596所描述的,表达并纯化人TREM-2蛋白。

[1068] 为了产生MOR041877,用编码二硫键桥连FabCys的重链和轻链的哺乳动物表达载体DNA转染真核HKB11细胞。在转染后第3或7天收获细胞培养物上清液,并进行CH1亲和色谱(Capture Select IgG-CH1,赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))。将缓冲液交换到1X杜氏PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm孔径)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并使用CE-SDS(LabChip GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))在变性、还原和非还原条件下分析FabCys的纯度。进行HP-SEC以分析处于天然状态的FabCys制剂。

[1069] TREM2-MOR041877Fab复合物的体外重组

[1070] 然后将纯化的TREM2与MOR042596Fab以1:1的摩尔比(浓度通过OD A280测量)混合。然后将所述复合物浓缩,接着上样到用50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、5%甘油平衡的Superdex 75柱(GE医疗集团生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))上。通过SDS-PAGE对峰级分进行分析,并将选定的级分合并进行结晶试验。

[1071] 结晶和结构确定

[1072] 将TREM2-MOR042596复合物浓缩至7.5mg/ml,然后在执行结晶筛选之前以20,000×g离心10分钟。使用坐滴蒸汽扩散装置在20℃下使晶体生长。将0.2μl TREM2-MOR41877复合物与0.2μl含20%PEG3350、0.2M酒石酸钾钠的储液混合,并将液滴针对80μl储液进行平衡。用20%甘油作为冻存保护剂从母液中收获晶体,并在液氮中直接快速冷冻。

[1073] 在瑞士同步辐射光源(Swiss Light Source)光束线X10SA(Villigen,瑞士)下,使用PILATUS 6M检测器在1.000Å波长收集数据集。在APRV程序套件(Kroemer M等人2004)中,分别使用XDS和XSCALE(Kabsch WJ 1993)对0.25°振荡角楔形处记录的衍射图像进行处理和缩放。通过使用移相器(McCoy AJ等人,2007)的分子置换并且以Fab和TREM2 Ig结构域的同源性模型作为搜索模型来获得初始结构。分别在Coot(Emsley P等人2004)和autoBuster(G等人2009)中进行模型的手动重建和随后的结构细化。

[1074] hTREM2上的MOR041877结合表位的阐释

[1075] 如上所述,我们获得了人TREM2/MOR041877Fab复合物的X射线共晶体结构。图21显示了TREM2残基与MOR041877相互作用的概况。

[1076] 从TREM2/MOR041877Fab复合物结构中,我们推导了结合MOR041877的TREM2表位,如表33所示。

[1077] 表33.结合MOR041877的TREM2表位。

[1078]

hTREM2上的序列段	残基
1区	S40-M41;W44-G45;R47
2区	H67-N68-L69-W70-L71-L72;F74-L75;R77
3区	D87-T88-L89

[1079] 表34给出了HCDR和LCDR环的序列以及TREM2/MOR041877Fab复合物结构中5 Å距离内的TREM2残基。

[1080] 表34.MOR041877的HCDR和LCDR序列以及5 Å内TREM2上的相互作用残基。

[1081]

CDR	序列	SEQ ID NO	5Å 内 hTREM2 上的相互作用残基
HCDR1	GFSLSTSGVGVS	84	N68-L69
HCDR2	LIFSDHDKIYSTSLKT	85	H67 ;L69 ;L72 ;F74-L75 ;R77
HCDR3	TLIDRSVYFDY	86	W44-G45 ;R47 ;N68-L69-W70-L71-L72
LCDR1	SGSSSNIGHHYVS	97	S40-M41;W44; W70-L71;T88-L89
LCDR2	DNTNRPS	98	-
LCDR3	ATWDGLMNSIV	99	L71-L72 ;F74 ;D87 ;L89

[1082] 实例6:3周铜宗模型中鼠源化TREM2抗体(MOR044698-mu)的预防/伴随治疗

[1083] 铜宗模型是一种毒素诱导的脱髓鞘模型,用于研究CNS的髓鞘形成过程,其中外周免疫系统的参与很小。铜宗(一种铜螯合剂)诱导线粒体损伤,并最终诱导少突胶质细胞死亡,而少突胶质细胞前体细胞不受影响,并且仍可以发挥其正常功能(增殖、成熟和再髓鞘化)。铜宗模型非常适合用于测试脱髓鞘疾病的再生治疗范例,例如比如独立于侵袭性外周免疫细胞而增强髓鞘再生的MS。

[1084] 通过CRISPR/Cas技术将包含牛生长激素聚A信号序列的人TREM2cDNA引入小鼠TREM2基因的ATG中来产生人源化TREM2小鼠。建立者系的特征是它们在骨髓衍生的巨噬细胞和脑小胶质细胞中表达hTREM2。然后通过靶向基因座扩增(TLA)确认转基因的整合。

[1085] 将人源化TREM2 Crispr敲入小鼠(hTREM-KI)用cuprizone(食物中的0.2%)处理3周,在此之前一天以及在此之后每周两次MOR044698-mu(包含SEQ ID NO:140的轻链序列和SEQ ID NO:141的重链序列)和同种型对照MOR03207(简称:3207)i.p.,30mg/kg。在用抗体和铜宗进行预防/伴随治疗3周后,处死动物并在冠状自由漂浮的脑切片(20μm-30μm厚)上进行组织学。使用TREM2和Iba1抗体评估小胶质细胞中的hTREM2水平。

[1086] 如图22A、22B所示,在MOR044698-mu处理的动物中,皮质中Iba1阳性小胶质细胞中的hTREM2水平比在3周的铜宗模型中的同种型高约3倍。hTREM2(经AF1828抗体染色)的定量是通过斐济(Fiji)(转换为8位)在阈值(Iba1,绿色:10,TREM2,红色:15)下对荧光tiff图像(栈最大化并导出为tiff快照,无需进行图像调整,20倍)定量来进行的。读数:面积%;将TREM2%面积归一化为Iba1%面积(x100),平均每只动物皮层有两个图像栈,每只动物染色了2个脑切片,每个脑部切片有1个图像栈。

[1087] 结论

[1088] 这些数据表明,用MOR044698进行的全身治疗稳定脑中小胶质细胞中的TREM2,并且由此增加其水平,并可能导致TREM2信号传导和功能增强。

[1089] 总结

[1090] 总体而言,采用了一种策略来鉴定一个或多个TREM2抗体,其通过减少组成型或炎症诱导的TREM2的脱落并由此增加TREM2的细胞活性来促进TREM2在人细胞系统(即巨噬细胞或小胶质细胞)中的功能。此类抗体可用于治疗多种神经退行性疾病。

[1091] 已鉴定出抗TREM2抗体(hTREM2抗体),它们以亚纳摩尔级的细胞亲和力与人M2A巨噬细胞结合,并且显示出极少的供体到供体之间的变异。本发明的抗体结合人TREM2的IgSF结构域,并且还识别食蟹猴TREM2。这已在体外ELISA和细胞系中得到证实。出人意料地,这些抗体与TREM2的结合抑制TREM2胞外域从人M2A巨噬细胞的脱落,并因此增加了细胞表面上TREM2的表达。在功能上,本发明的TREM2抗体还在人巨噬细胞以及人iPS衍生的小胶质细胞样细胞中增强吞噬能力并增强C5a介导的趋化性。此外,本发明的抗体还增强人巨噬细胞以及人iPS来源的小胶质细胞样细胞的趋化性。本发明的抗体还直接活化TREM2,如通过NFAT依赖性细胞报道基因测定以及通过在TREM2刺激后人巨噬细胞中syk磷酸化增加所示。

[1092] 本发明的抗体显示出对TREM2的高度特异性,不与任何其他靶标结合并且是全人抗体。本发明的抗体显示与TREM2上IgSF区中的新表位结合,并表现出稳定和活化TREM2。

[1093] 本发明的抗体还已经基于它们开发的适合性进行了选择:例如本发明的抗体在CDR中缺乏翻译后修饰,它们不聚集,它们是由细胞系统大量产生,它们不显示剪切产物,并表现出明确的熔点和等电点。最后,它们增加的半衰期导致在脑中更长的持续作用,其容许剂量优化以达到预期的临床效果并减少给药频率,从而提高患者依从性。

```
TREM2_ 人 1    1   MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPC
TREM2_ 人 2    1   MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPC
TREM2_ 人 3    1   MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPC
                   ************************************************************

TREM2_ 人 1   61   QRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADT
TREM2_ 人 2   61   QRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADT
TREM2_ 人 3   61   QRVVSTHNLWLLSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADT
                   ************************************************************

TREM2_ 人 1  121   LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFFPTSILLLLA
TREM2_ 人 2  121   LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRAERHVKE------------
TREM2_ 人 3  121   LRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRPSQGSHLPSC----------
                   ****************************************

TREM2_ 人 1  181   CIFLIKILAASALWAAAWHGQRPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTL-PGLRDT----------
TREM2_ 人 2  169   ----------------------DDGRKSPGEVPPGTSPACILATWFPGLLVLLWQET-TLP
TREM2_ 人 3  172   -LSK-----------------EPLGRRNPLP---------THPHPSPPGLHLSHQDSSQRP
                                          * : *          :    ***

TREM2_ 人 1  231   ----------------  (SEQ ID NO: 1)
TREM2_ 人 2  207   EH-CFSWTLEAGTG--  (SEQ ID NO: 2)
TREM2_ 人 3  207   LGCSLANTEARDTSTQ  (SEQ ID NO: 3)
```

图1A

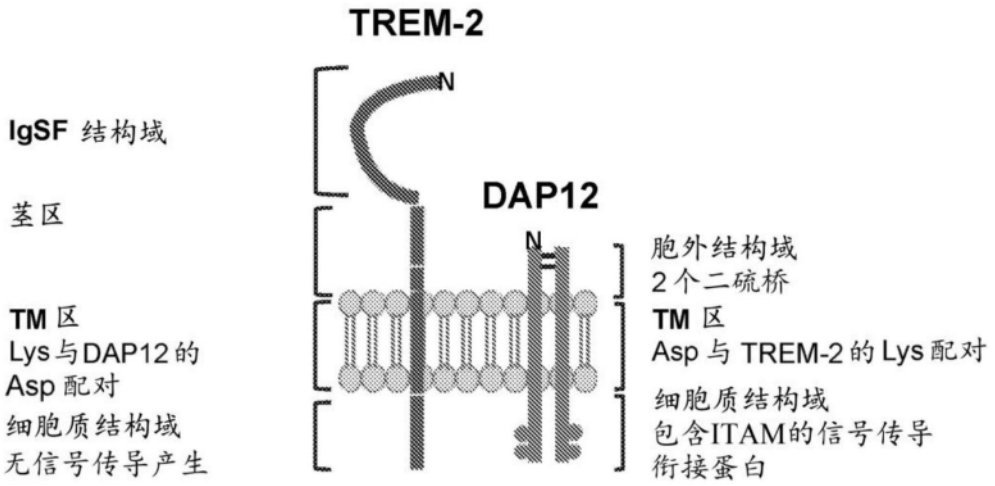


图1B

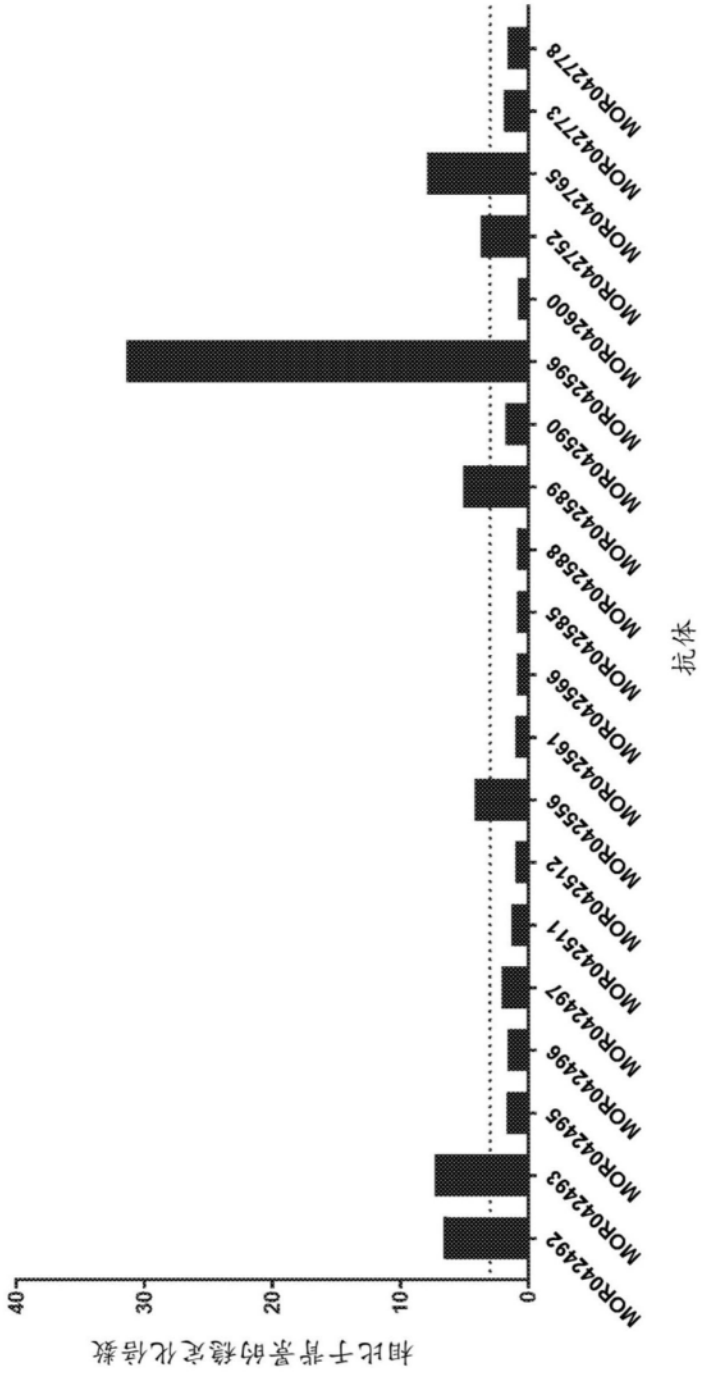

MOR04242
MOR04243
MOR04244
MOR04245
MOR04246
MOR04247
MOR04251
MOR04251
MOR04255
MOR04256
MOR04256
MOR04258
MOR04258
MOR04259
MOR04259
MOR04260
MOR04275
MOR04276
MOR04277
MOR04277
抗体
0
10
20
30
40
相比于背景的稳定化倍数

图2

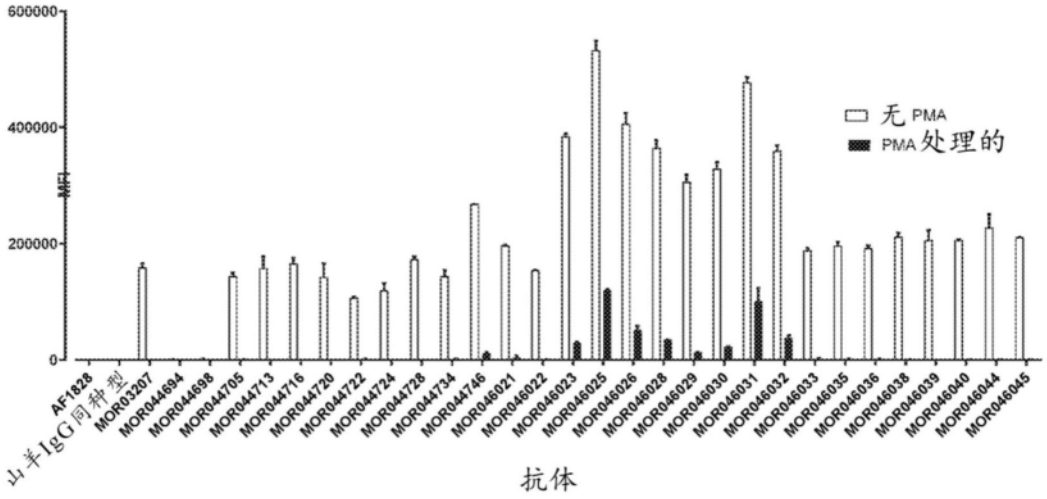

600000
400000
200000
0
MFI
无 PMA
PMA 处理的
AF1828
山羊IgG同种型
MOR03207
MOR044694
MOR044698
MOR044705
MOR044713
MOR044716
MOR044720
MOR044722
MOR044724
MOR044728
MOR044734
MOR044746
MOR046021
MOR046022
MOR046023
MOR046025
MOR046026
MOR046028
MOR046029
MOR046030
MOR046031
MOR046032
MOR046033
MOR046035
MOR046036
MOR046038
MOR046039
MOR046040
MOR046044
MOR046045
抗体

图3

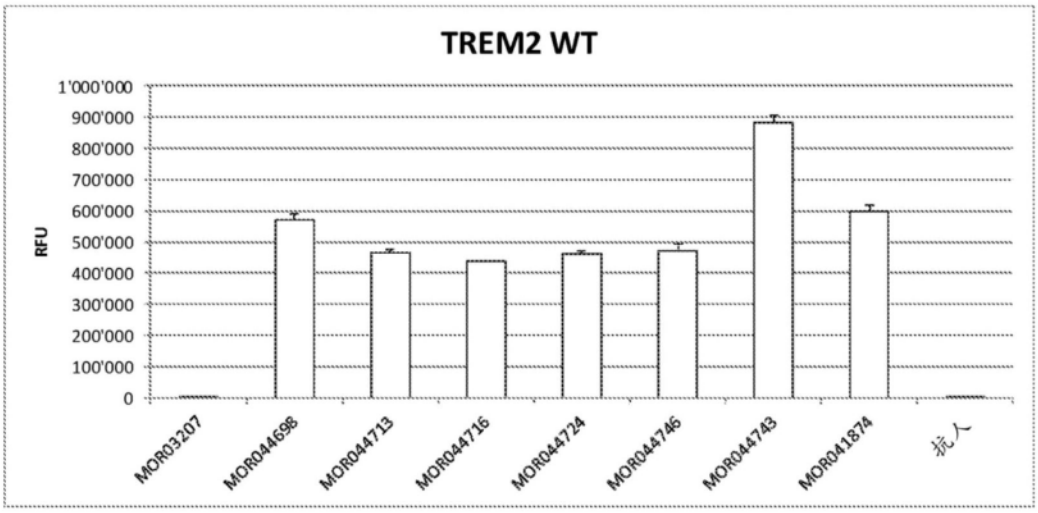

TREM2 WT
1'000'000
900'000
800'000
700'000
600'000
500'000
400'000
300'000
200'000
100'000
0
RFU
MOR03207
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724
MOR044746
MOR044743
MOR041874
抗人

图4A

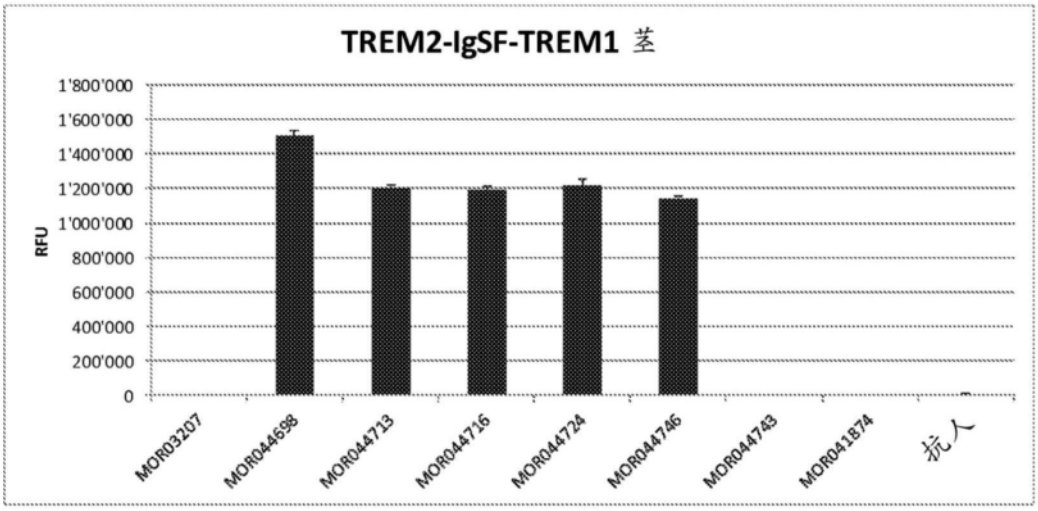

TREM2-IgSF-TREM1 茎
RFU
1'800'000
1'600'000
1'400'000
1'200'000
1'000'000
800'000
600'000
400'000
200'000
0
MOR03207
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724
MOR044746
MOR044743
MOR041874
抗人

图4B

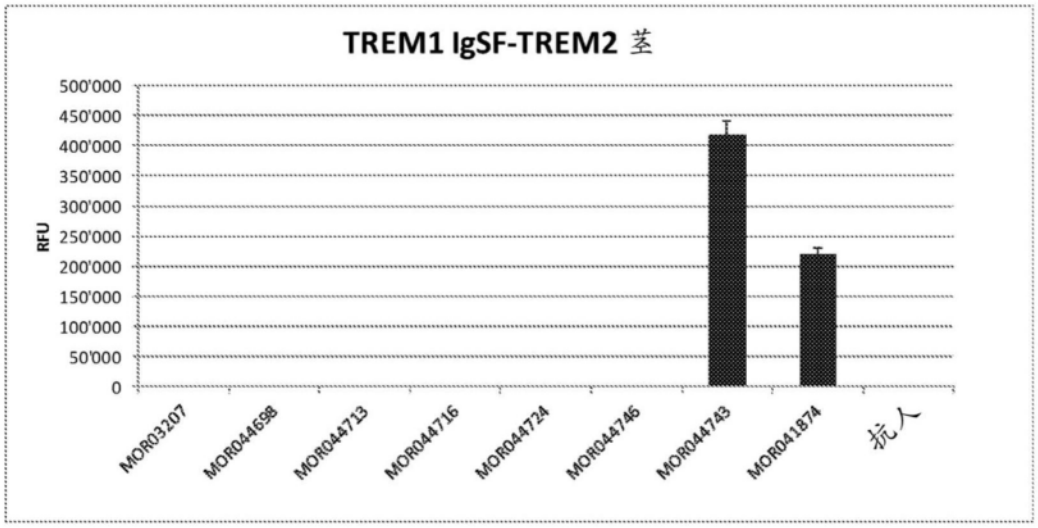

TREM1 IgSF-TREM2 茎
RFU
500'000
450'000
400'000
350'000
300'000
250'000
200'000
150'000
100'000
50'000
0
MOR03207
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724
MOR044746
MOR044743
MOR041874
抗人

图4C

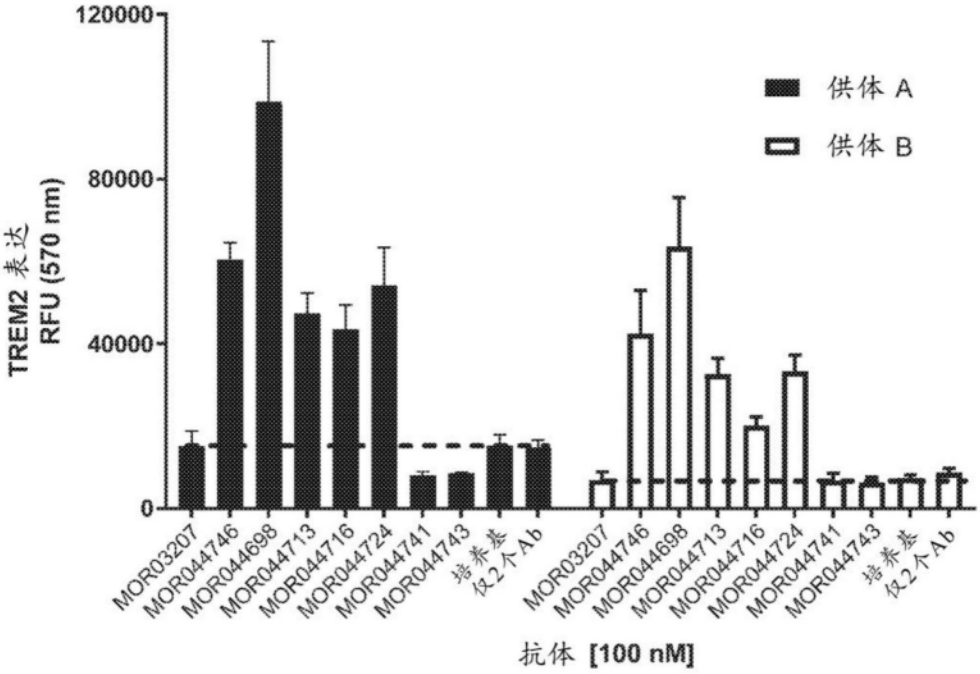

120000
80000
40000
0
TREM2 表达
RFU (570 nm)
供体 A
供体 B
MOR03207
MOR044746
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724
MOR044741
MOR044743
培养基
仅2个Ab
抗体 [100 nM]

图5

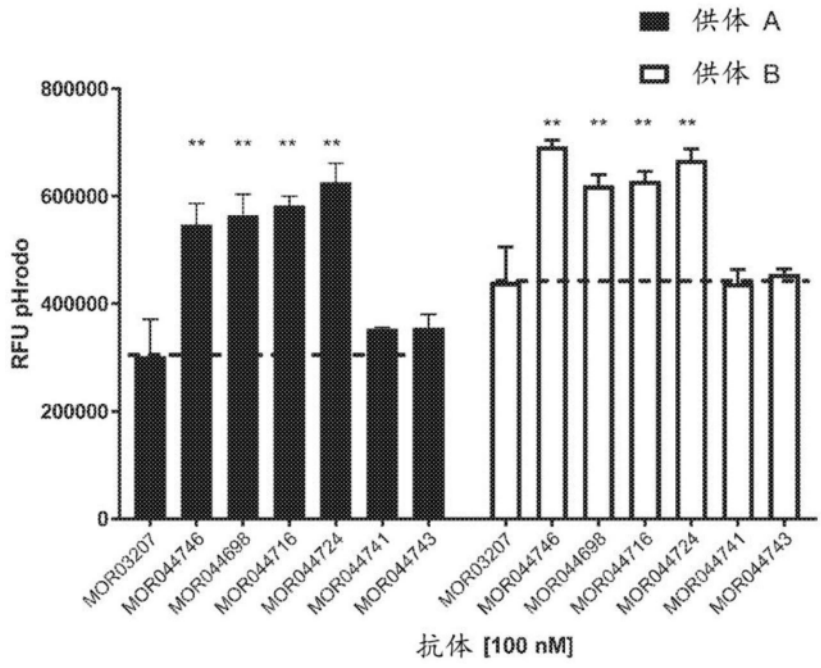

800000
600000
400000
200000
0
RFU pHrodo
供体 A
供体 B
**
MOR03207
MOR044746
MOR044698
MOR044716
MOR044724
MOR044741
MOR044743
抗体 [100 nM]

图6A

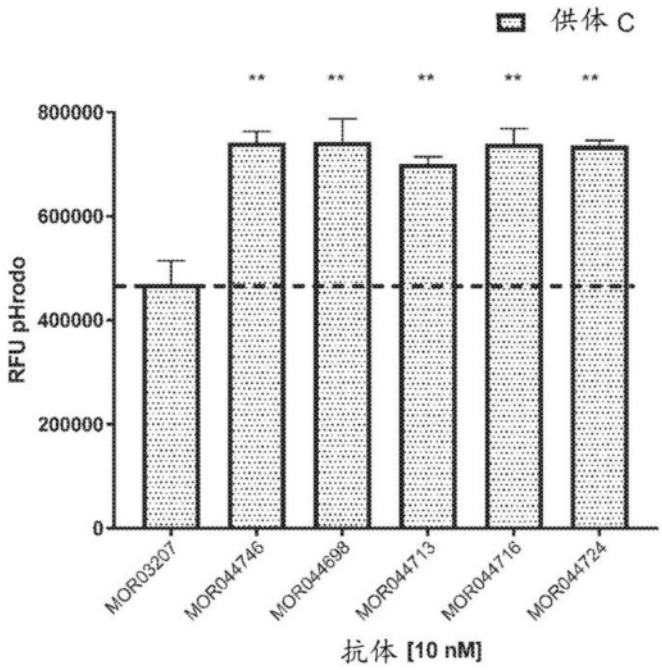

供体 C
**
800000
600000
400000
200000
0
RFU pHrodo
MOR03207
MOR044746
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724
抗体 [10 nM]

图6B

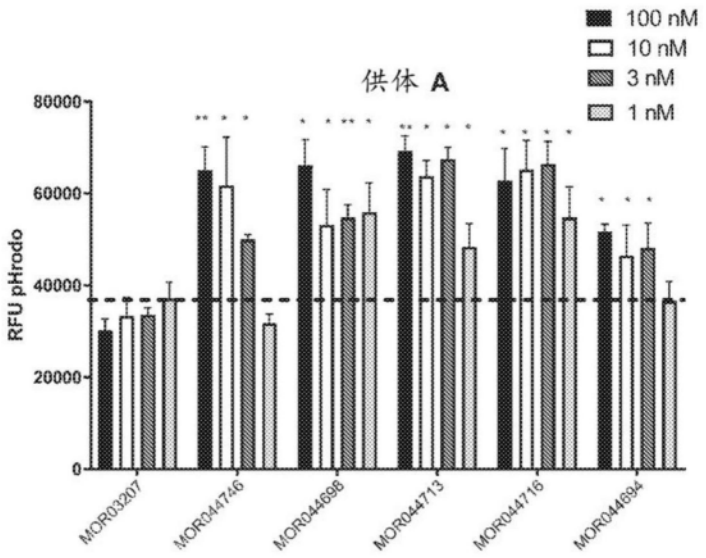

100 nM
10 nM
3 nM
1 nM
供体 A
80000
60000
40000
20000
0
RFU pHrodo
MOR03207
MOR044746
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044694

图7A

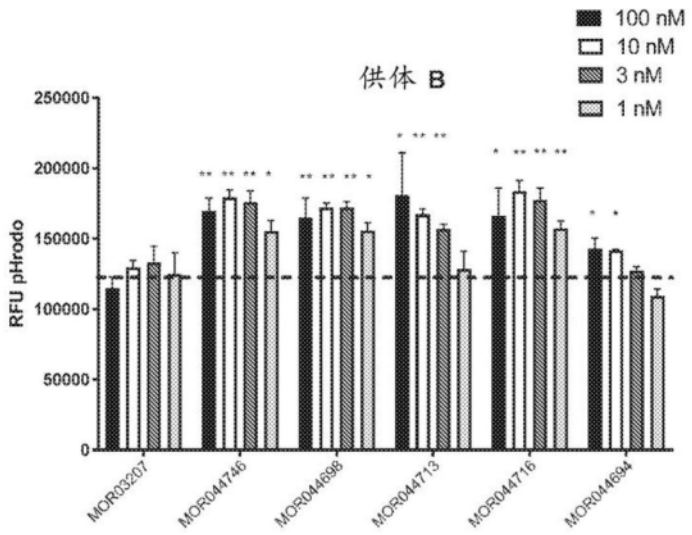

供体 B
100 nM
10 nM
3 nM
1 nM
RFU pHrodo
250000
200000
150000
100000
50000
0
MOR03207
MOR044746
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044694

图7B

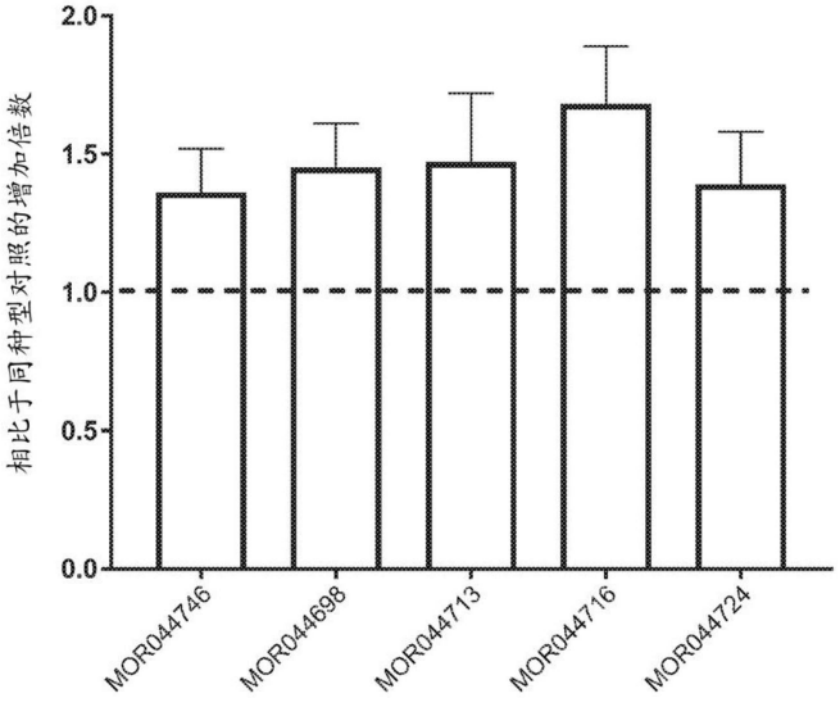

相比于同种型对照的增加倍数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MOR044746
MOR044698
MOR044713
MOR044716
MOR044724

图8

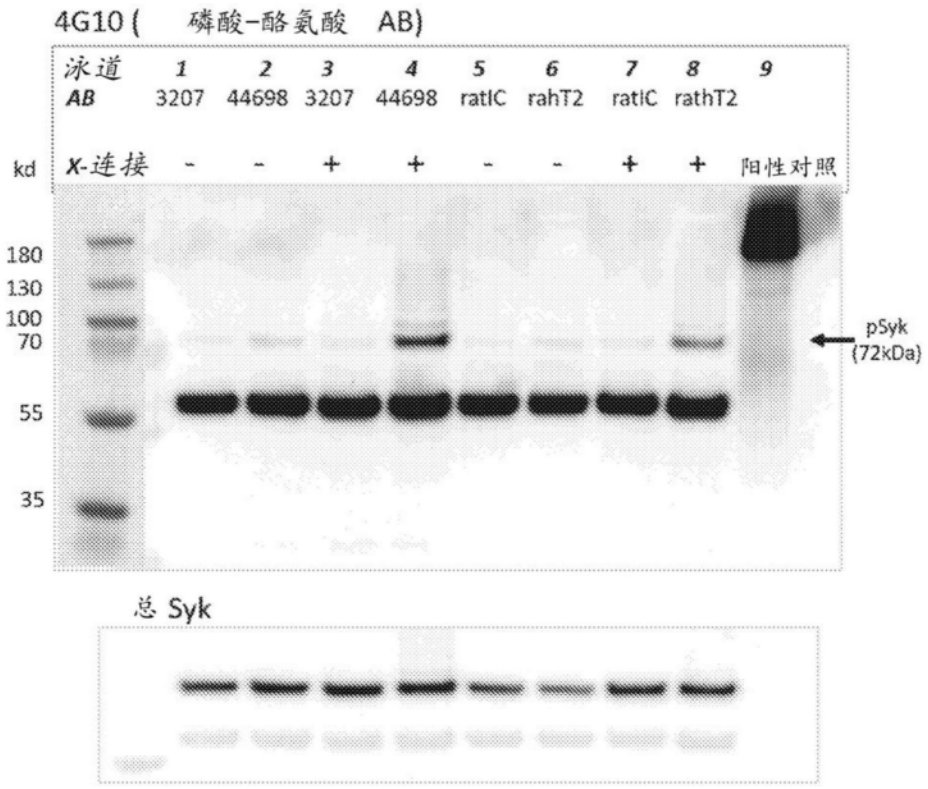

4G10 (磷酸-酪氨酸 AB)
泳道 1 2 3 4 5 6 7 8 9
AB 3207 44698 3207 44698 ratIC rahT2 ratIC rathT2
kd X-连接 - - + + - - + + 阳性对照
180
130
100
70
55
35
pSyk
(72kDa)
总 Syk

图9A

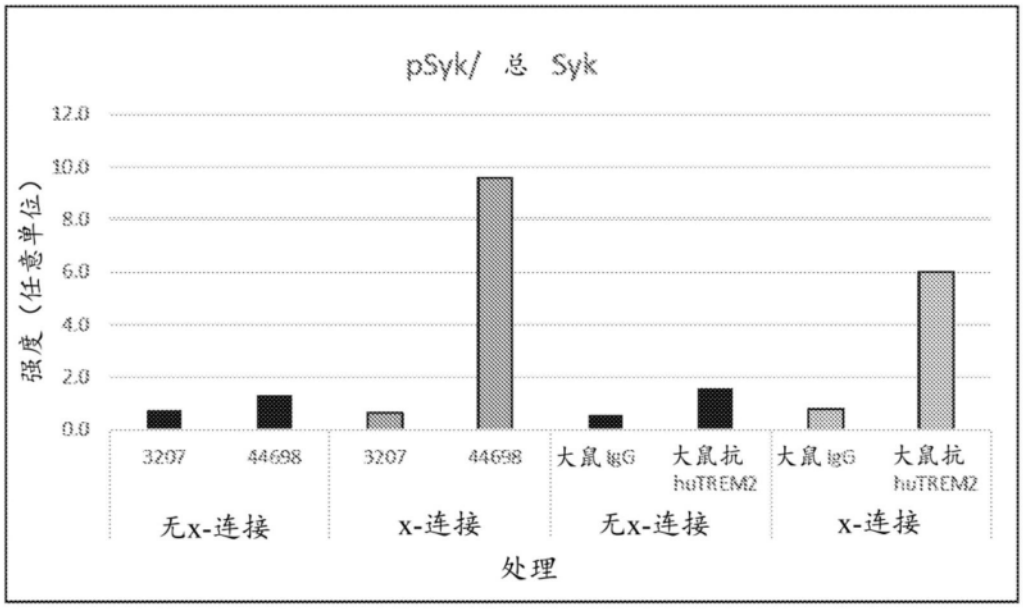
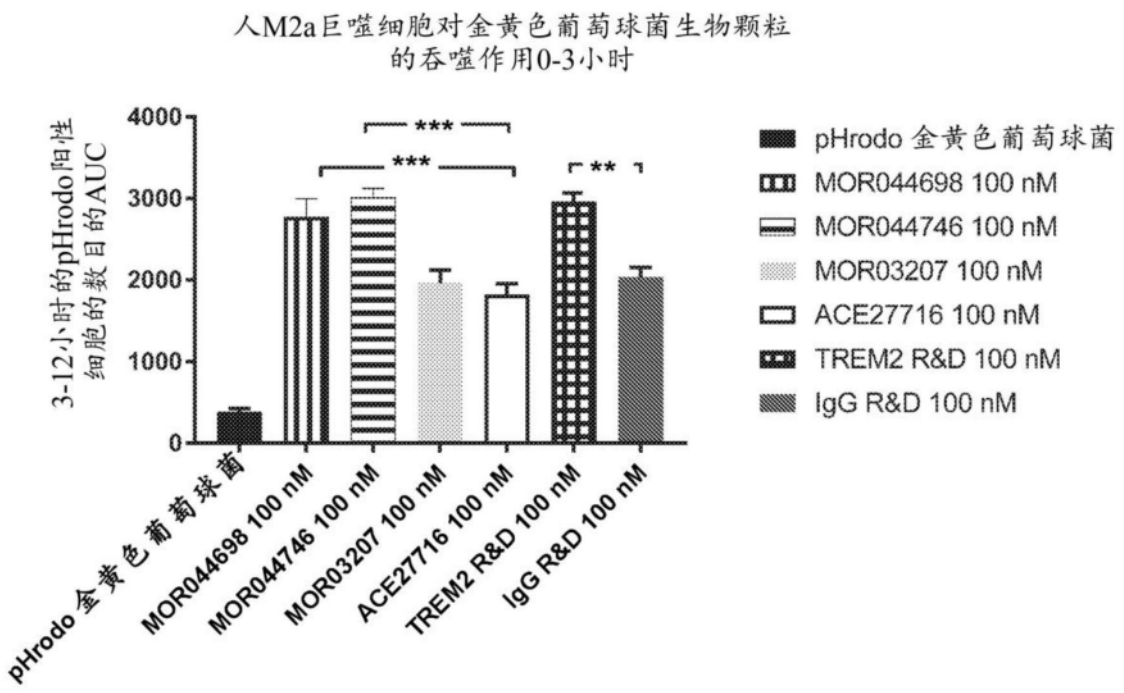
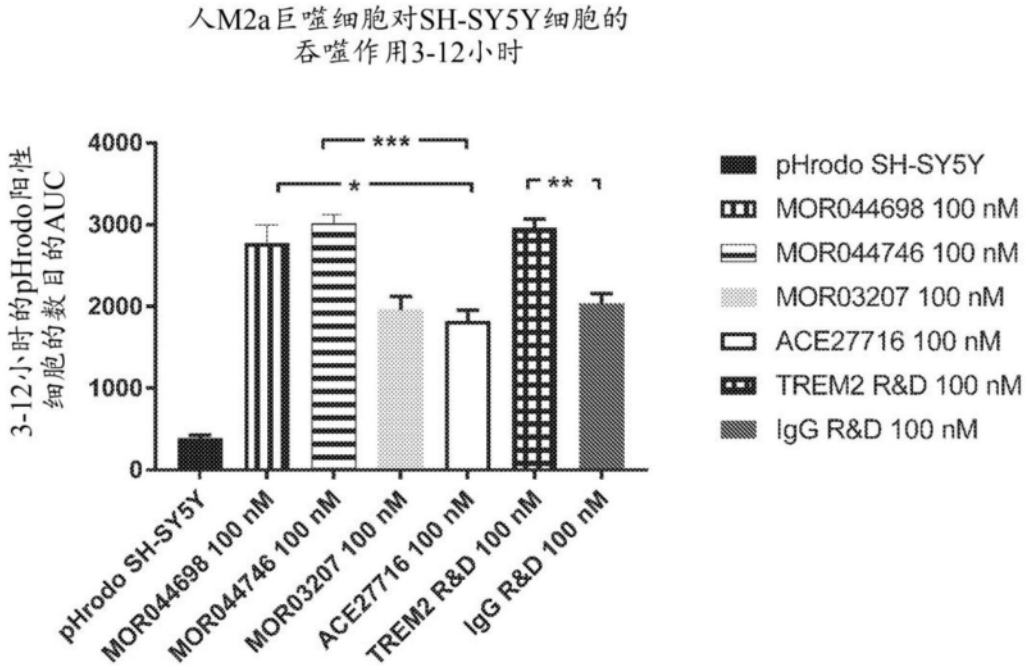

pSyk/ 总 Syk
强度（任意单位）
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
3207
44698
3207
44698
大鼠 IgG
大鼠抗 huTREM2
大鼠 IgG
大鼠抗 huTREM2
无X-连接
X-连接
无X-连接
X-连接
处理

图9B



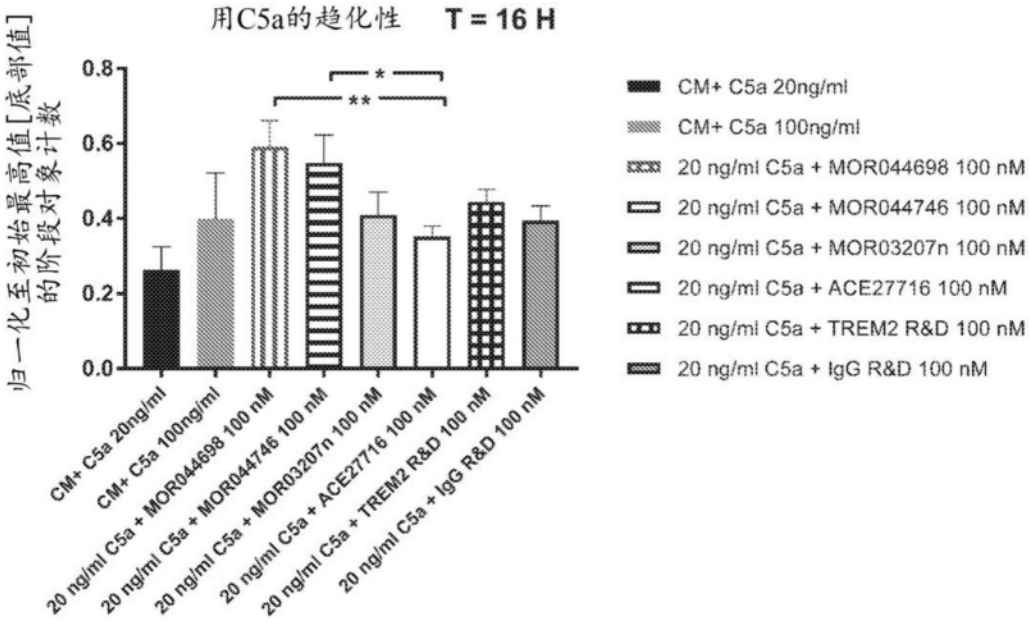
数据表示为平均值 +/- s.d. (N = 3)。统计分析使用学生t检验进行:
*P < 0.05; **P < 0.01; ***P . 0.001。

图10



数据表示为平均值 +/- s.d. (N = 3)。统计分析使用学生t检验进行:
*P < 0.05; **P < 0.01; ***P . 0.001。

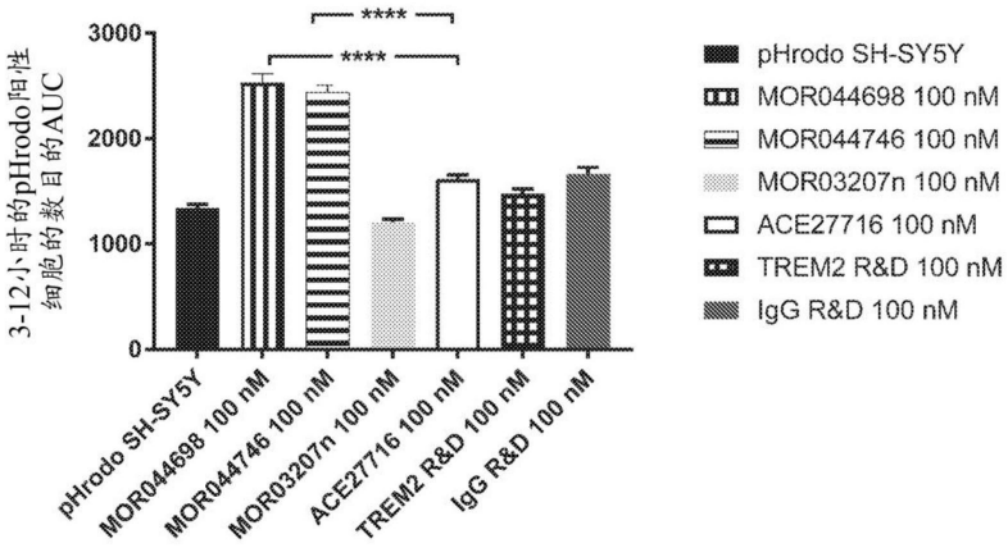
图11



数据表示为平均值 +/- s.d. (N = 3)。统计分析使用学生t检验进行:
*P < 0.05; **P < 0.01; ***P . 0.001。

图12

人iPSC衍生的小胶质细胞对SH-SY5Y细胞的吞噬作用0-20小时



数据表示为平均值+/- s.d. (N = 3)。统计分析使用学生t检验进行:
*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001,****P < 0.0001。

图13

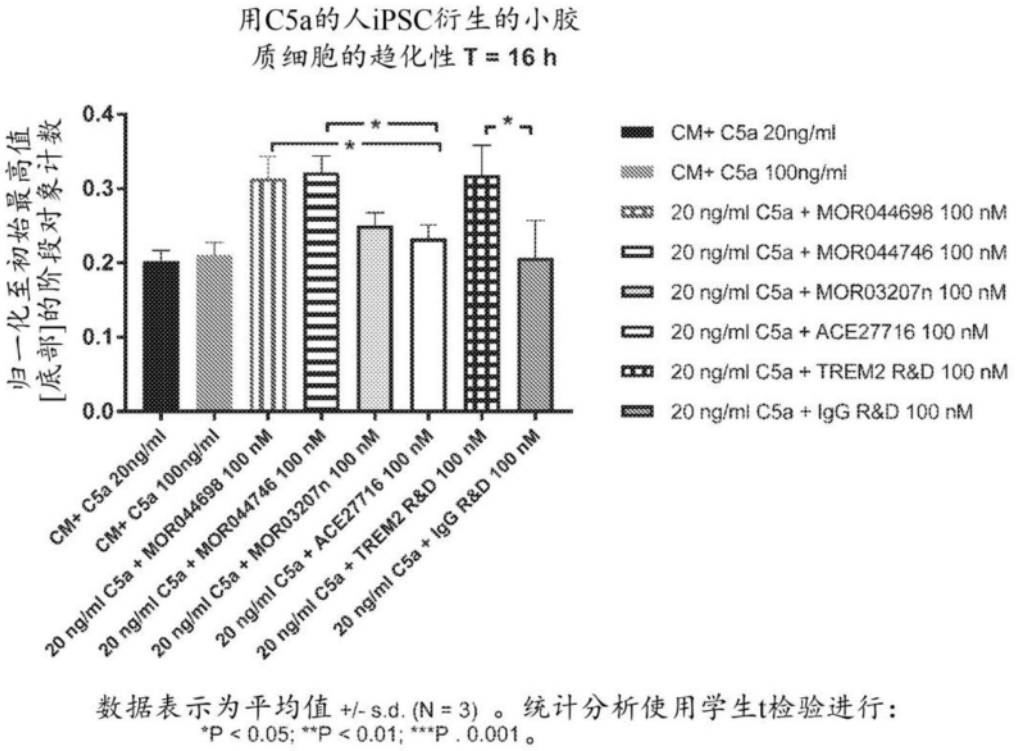

用C5a的人iPSC衍生的小胶质细胞的趋化性 T = 16 h
归一化至初始最高值[底部]的阶段对象计数
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
*
CM+ C5a 20ng/ml
CM+ C5a 100ng/ml
20 ng/ml C5a + MOR044698 100 nM
20 ng/ml C5a + MOR044746 100 nM
20 ng/ml C5a + MOR03207n 100 nM
20 ng/ml C5a + ACE27716 100 nM
20 ng/ml C5a + TREM2 R&D 100 nM
20 ng/ml C5a + IgG R&D 100 nM
CM+ C5a 20ng/ml
CM+ C5a 100ng/ml
20 ng/ml C5a + MOR044698 100 nM
20 ng/ml C5a + MOR044746 100 nM
20 ng/ml C5a + MOR03207n 100 nM
20 ng/ml C5a + ACE27716 100 nM
20 ng/ml C5a + TREM2 R&D 100 nM
20 ng/ml C5a + IgG R&D 100 nM
数据表示为平均值 +/- s.d. (N = 3) 。统计分析使用学生t检验进行:
*P < 0.05; **P < 0.01; ***P . 0.001。

图14

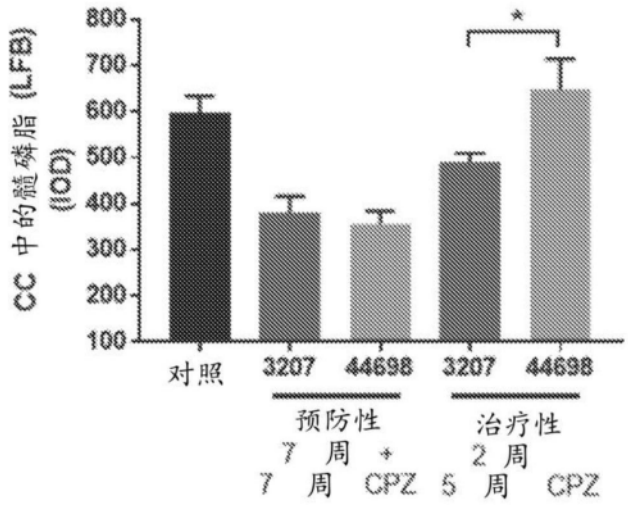

CC 中的髓磷脂 (LFB) (IOD)
800
700
600
500
400
300
200
100
*
对照
3207
44698
3207
44698
预防性
7 周 +
7 周 CPZ
治疗性
2 周
5 周 CPZ

图15A

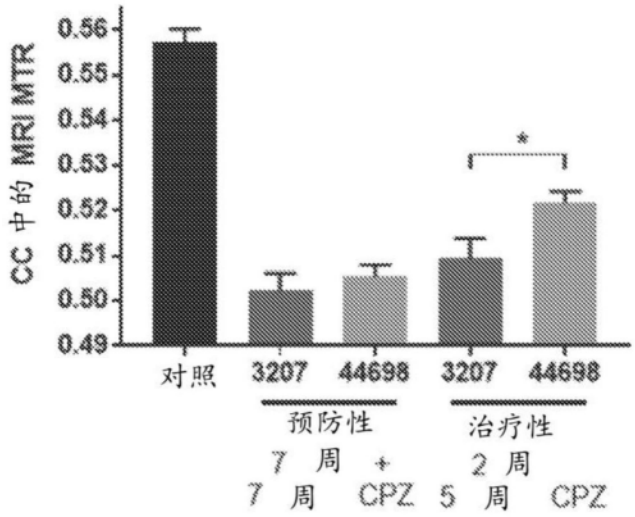

CC 中的 MRI MTR
0.56
0.55
0.54
0.53
0.52
0.51
0.50
0.49
*
对照
3207
44698
3207
44698
预防性
治疗性
7 周 + 7 周 CPZ
2 周 5 周 CPZ

图15B

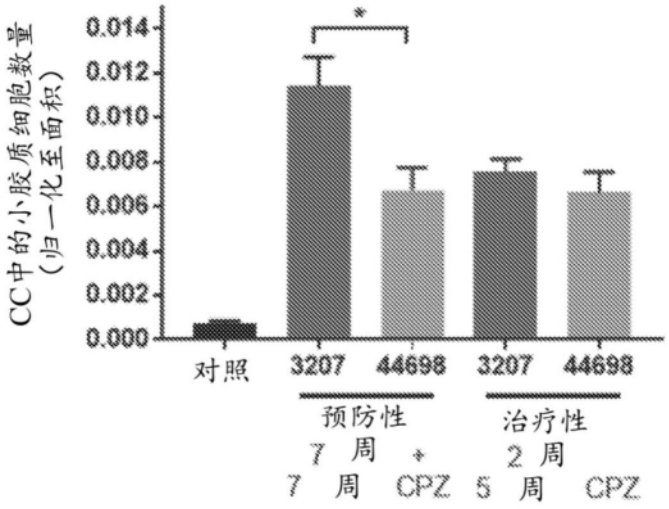

CC中的小胶质细胞数量
(归一化至面积)
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
*
对照
3207
44698
3207
44698
预防性
治疗性
7 周 + 7 周 CPZ
2 周 5 周 CPZ

图15C

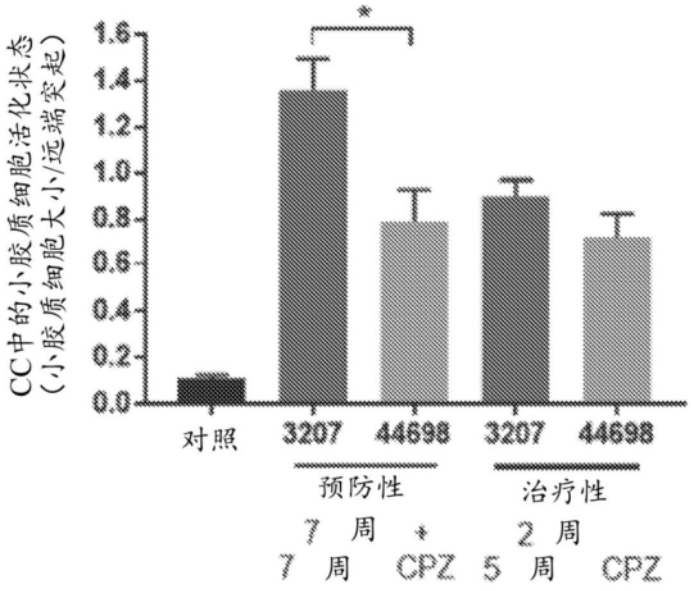

CC中的小胶质细胞活化状态
(小胶质细胞大小/远端突起)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
对照
3207
44698
3207
44698
预防性
治疗性
7 周 + 7 周 CPZ
2 周 5 周 CPZ

图15D

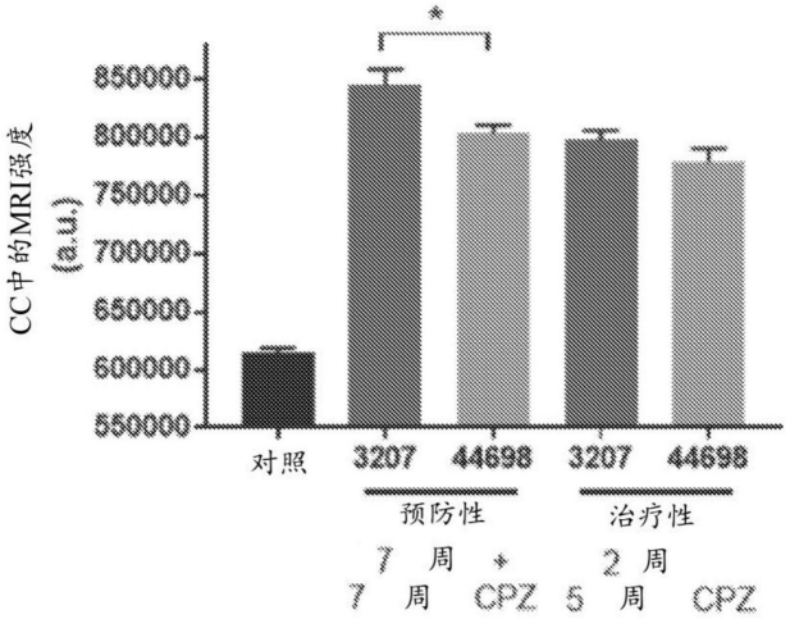

CC中的MRI强度
(a.u.)
850000
800000
750000
700000
650000
600000
550000
*
对照
3207
44698
3207
44698
预防性
治疗性
7 周 + 7 周 CPZ
2 周 5 周 CPZ

图15E

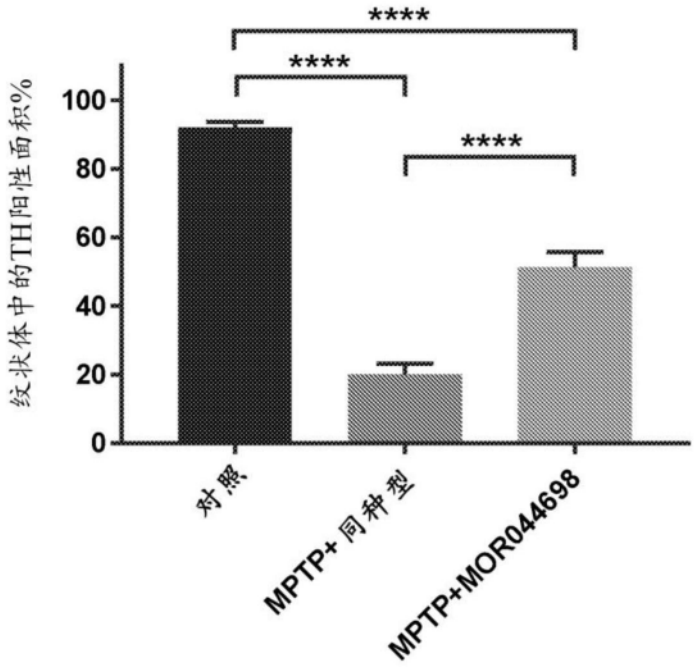


图16A

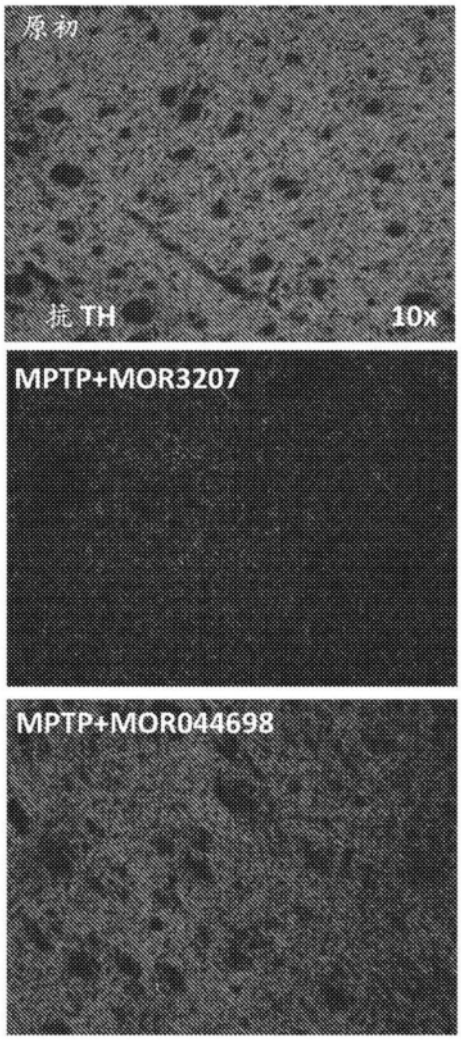


图16B

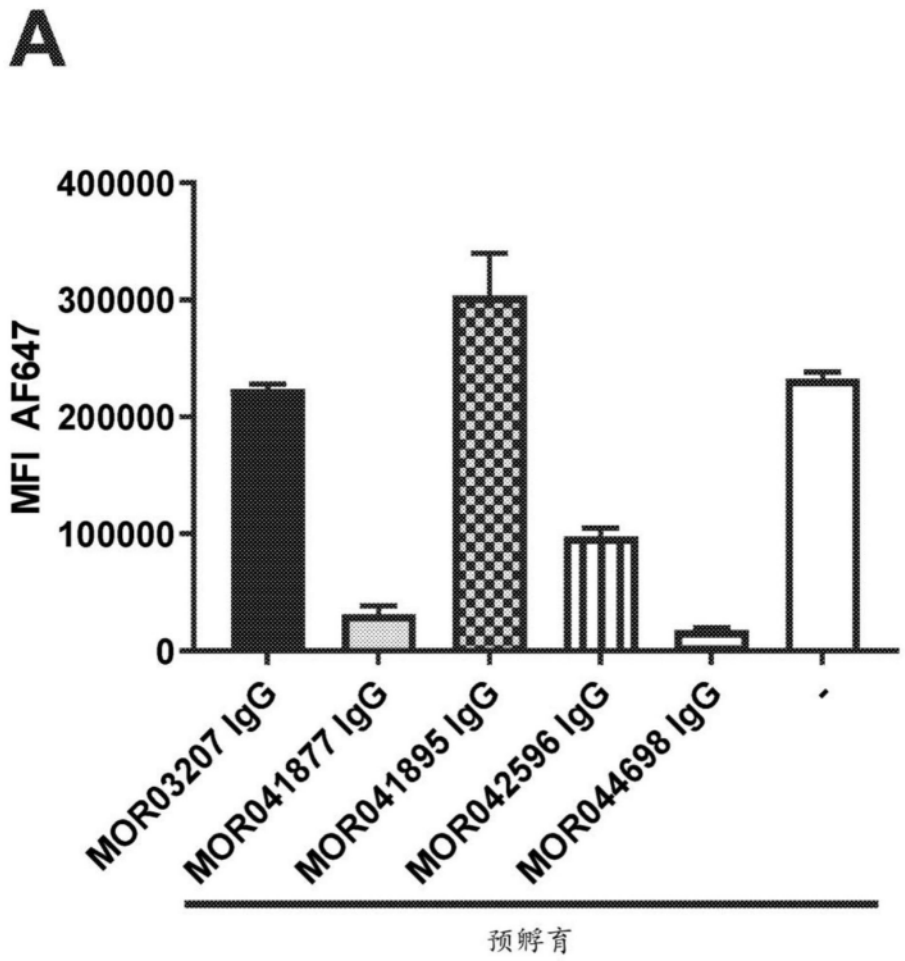

A
400000
300000
200000
100000
0
MFI AF647
MOR03207 IgG
MOR041877 IgG
MOR041895 IgG
MOR042596 IgG
MOR044698 IgG
-
预孵育

图17A

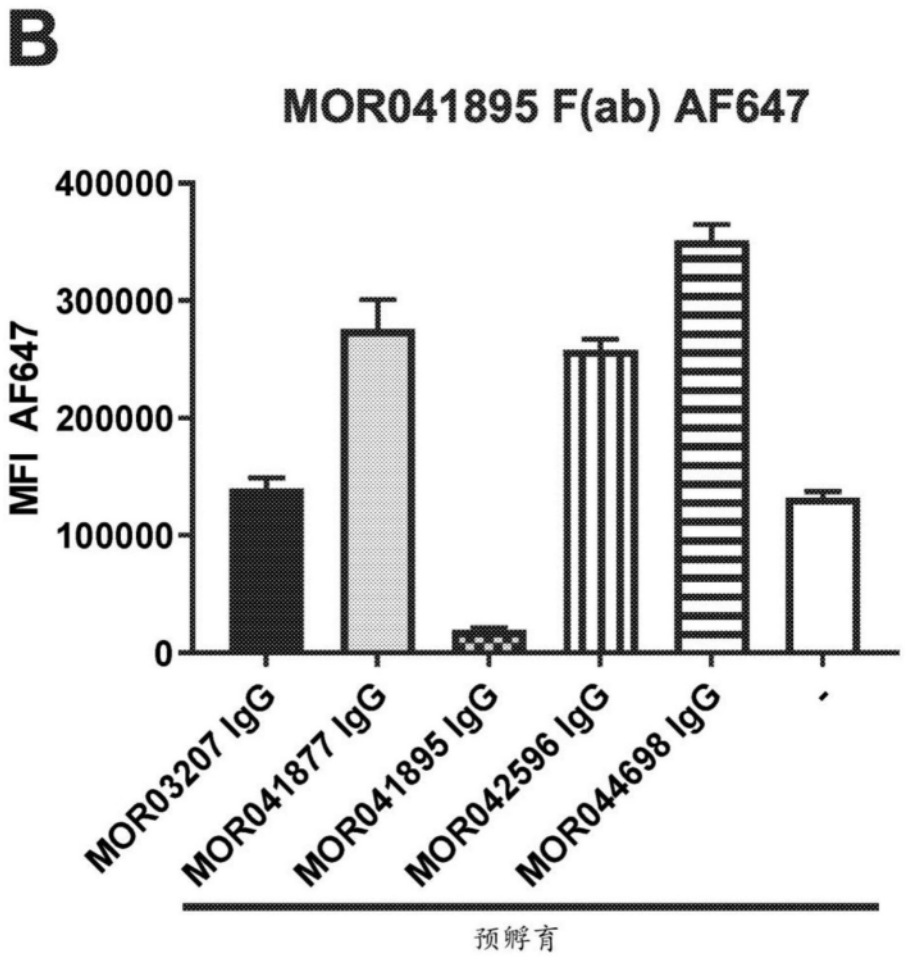

B
MOR041895 F(ab) AF647
MFI AF647
400000
300000
200000
100000
0
MOR03207 IgG
MOR041877 IgG
MOR041895 IgG
MOR042596 IgG
MOR044698 IgG
-
预孵育

图17B

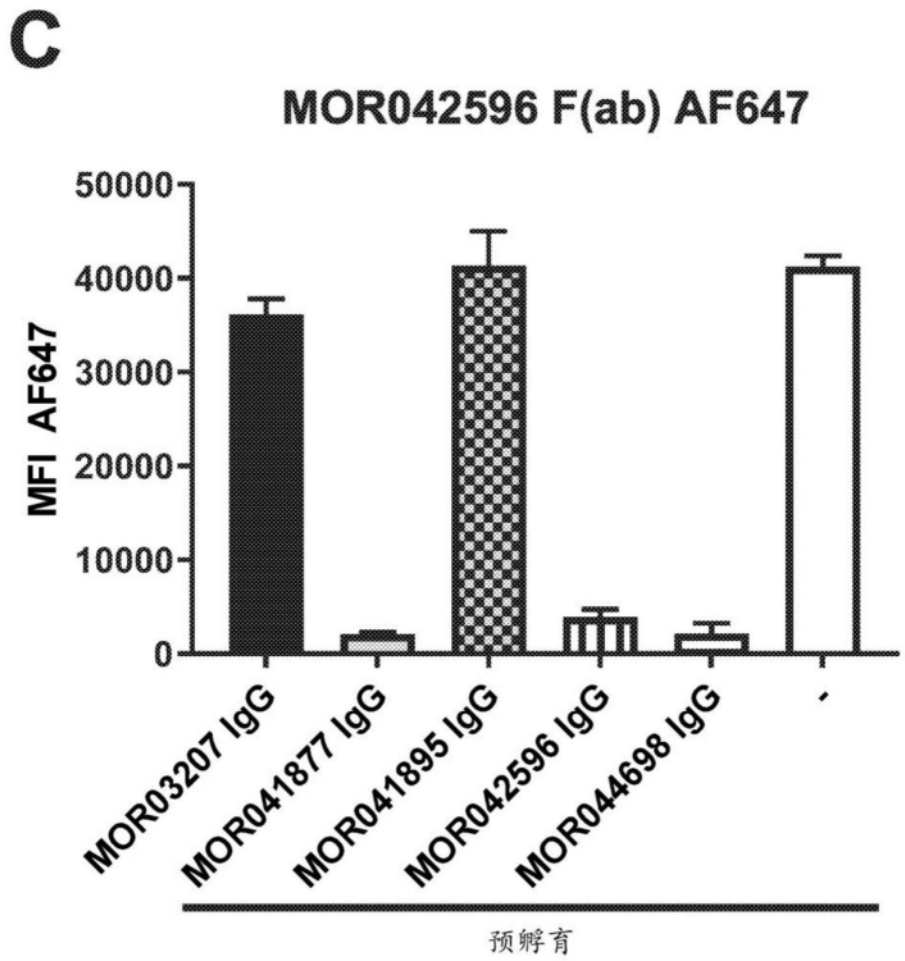

C
MOR042596 F(ab) AF647
MFI AF647
50000
40000
30000
20000
10000
0
MOR03207 IgG
MOR041877 IgG
MOR041895 IgG
MOR042596 IgG
MOR044698 IgG
-
预孵育

图17C

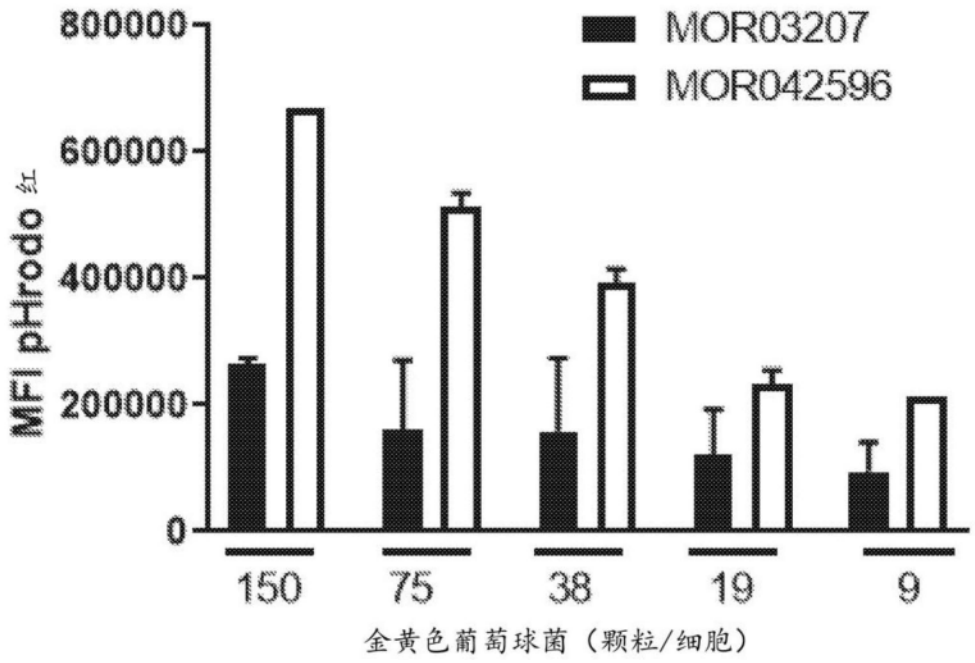

MOR03207
MOR042596
MFI pHrodo 红
800000
600000
400000
200000
0
150
75
38
19
9
金黄色葡萄球菌（颗粒/细胞）

图18

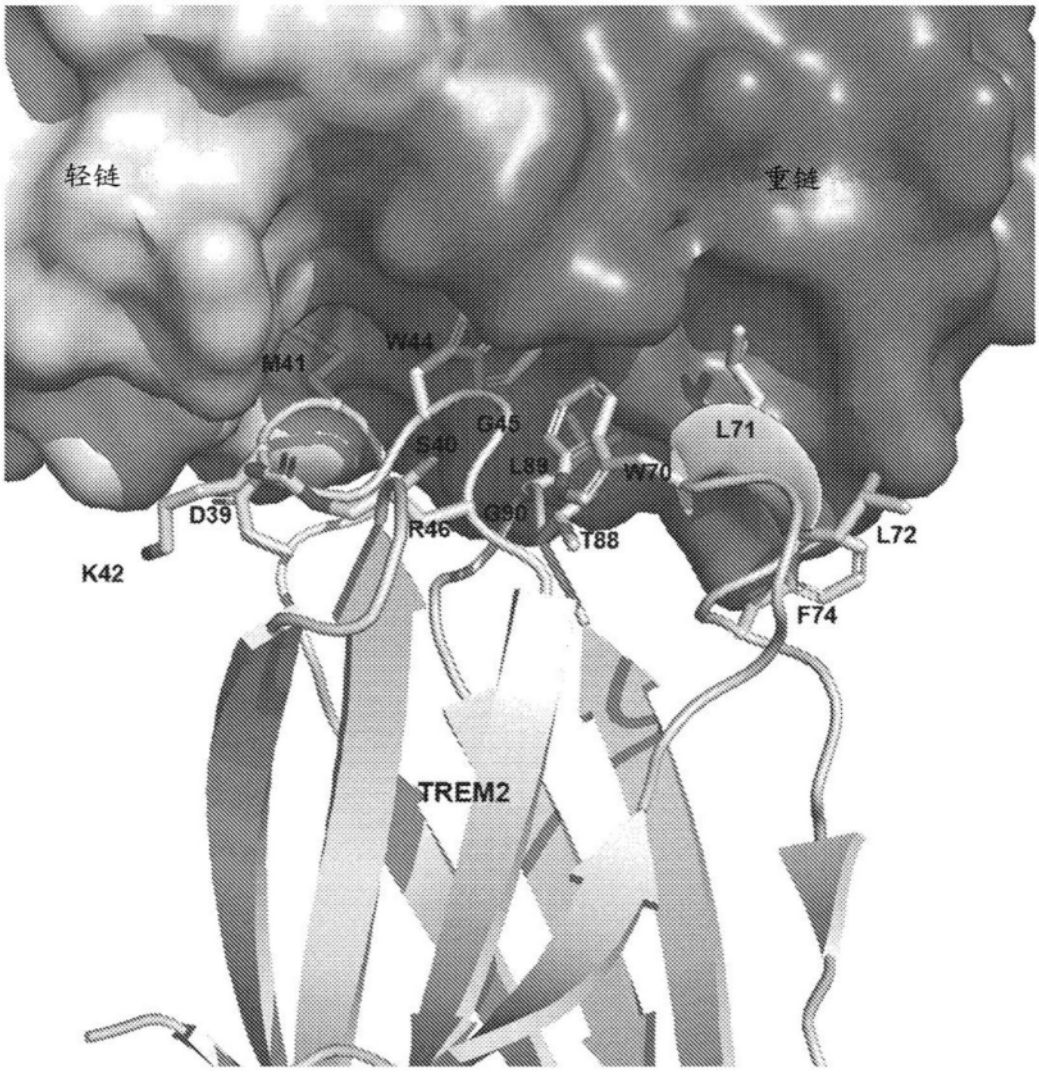

轻链
重链
W44
M41
G45
S40
L89
L71
W70
D39
R46
Q90
T88
L72
K42
F74
TREM2

图19

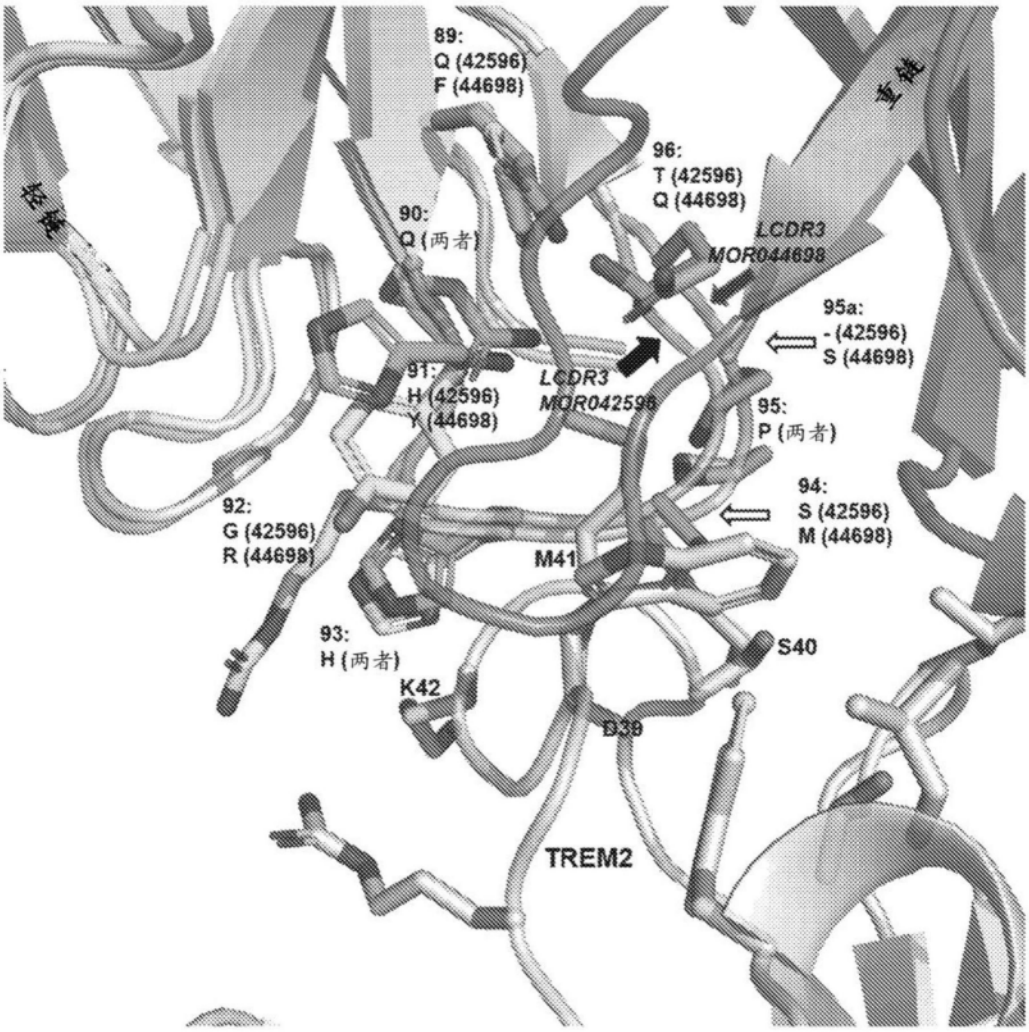

89:
Q (42596)
F (44698)
96:
T (42596)
Q (44698)
90:
Q (两者)
LCDR3
MOR044698
95a:
- (42596)
S (44698)
91:
H (42596)
Y (44698)
LCDR3
MOR042596
95:
P (两者)
94:
S (42596)
M (44698)
92:
G (42596)
R (44698)
M41
93:
H (两者)
S40
K42
D39
TREM2

图20

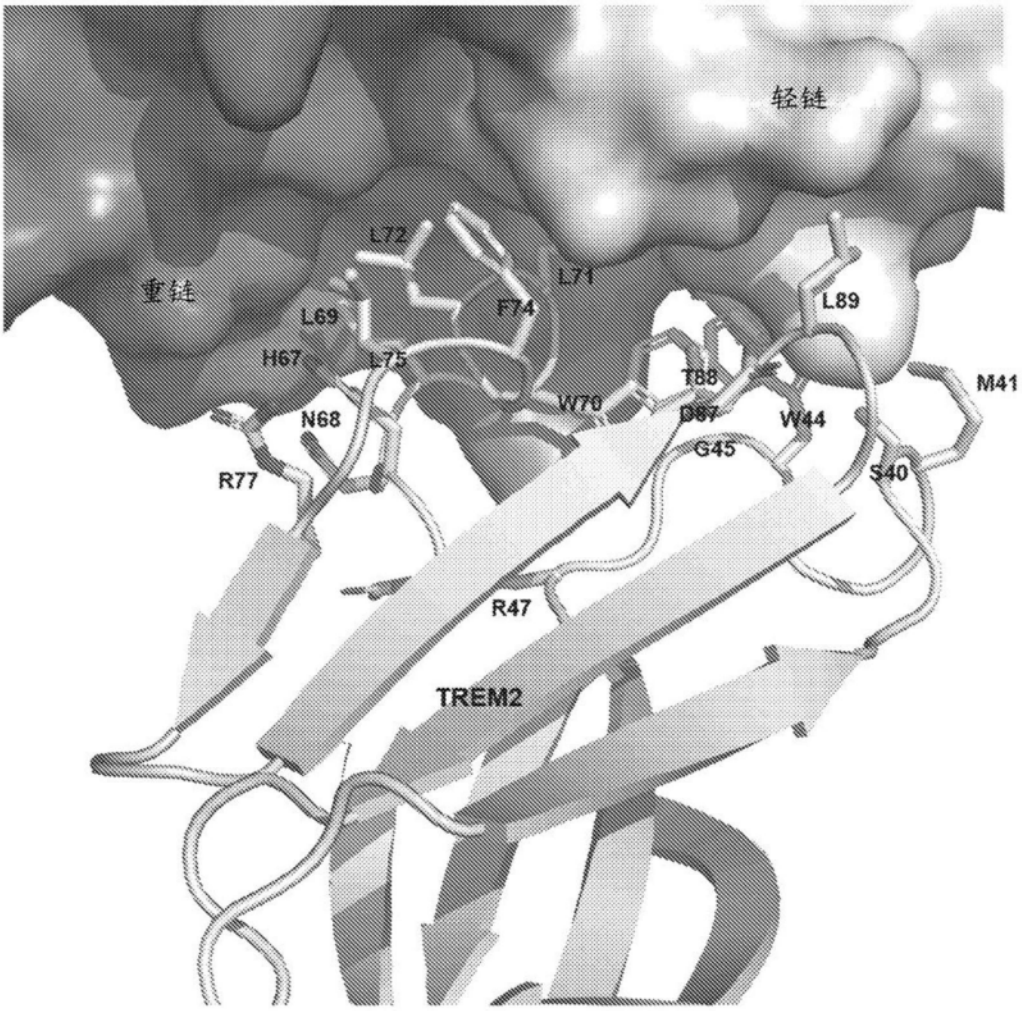

轻链
重链
L72
L71
L69
F74
L89
H67
L75
T88
M41
W70
N68
D87
W44
G45
R77
S40
R47
TREM2

图21

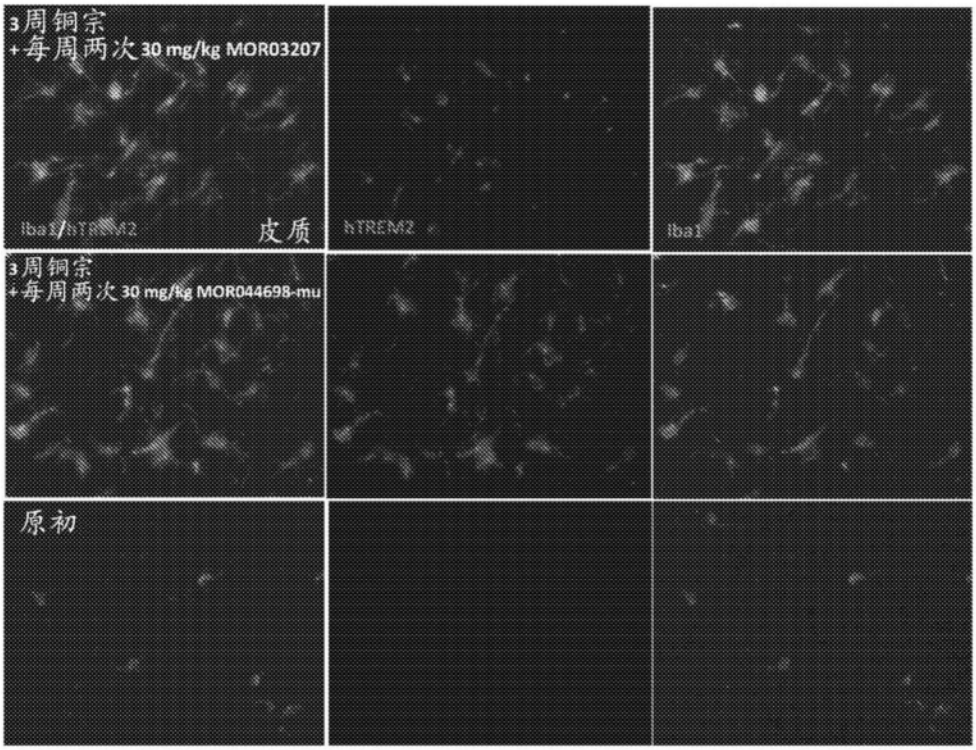

3周铜宗
+每周两次30 mg/kg MOR03207
Iba1/hTREM2
皮质
hTREM2
Iba1
3周铜宗
+每周两次30 mg/kg MOR044698-mu
原初

图22A

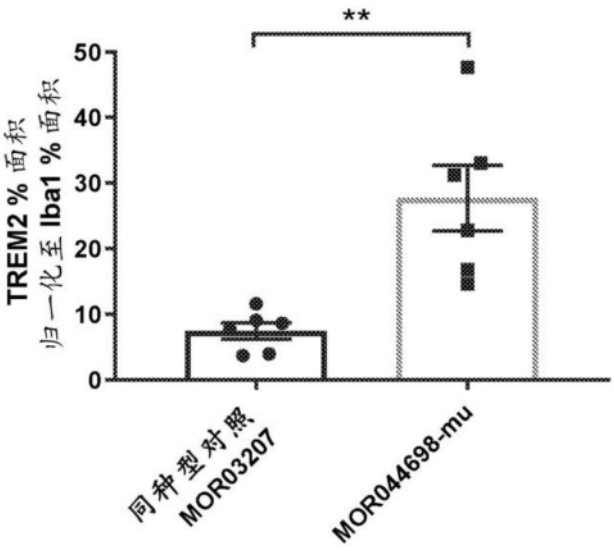

**
TREM2 % 面积
归一化至 Iba1 % 面积
50
40
30
20
10
0
同种型对照
MOR03207
MOR044698-mu

图22B