



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I879756 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：109105560

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 20 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/20 美國

62/808,141

(71)申請人：美商戴納立製藥公司(美國) DENALI THERAPEUTICS INC. (US)

美國

(72)發明人：丹尼斯 馬克 S DENNIS, MARK S. (US)；鄧肯 雪莉 DUNCAN, SHERIE

(US)；里辛哥 凱瑟琳 LISAINGO, KATHLEEN (US)；夢露 凱瑟琳 M

MONROE, KATHRYN M. (US)；朴 約書亞 I PARK, JOSHUA I. (US)；普洛

洛可 瑞秋 PROROK, RACHEL (US)；施 菊 SHI, JU (US)；斯里瓦斯塔娃 安

基塔 SRIVASTAVA, ANKITA (US)；凡 倫格里希 貝汀娜 VAN Lengerich,

BETTINA (US)；沃許 賴利 WALSH, RILEY (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2016/023019A2

WO 2017/062672A2

期刊 Lang-Yue Hu et al., Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) dependent microglial activation promotes

cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. Brain Behav

Immun. 68: doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.011. 2018 Feb: Epub 2017 Oct 16. 132-145.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：14 共 182 頁

(54)名稱

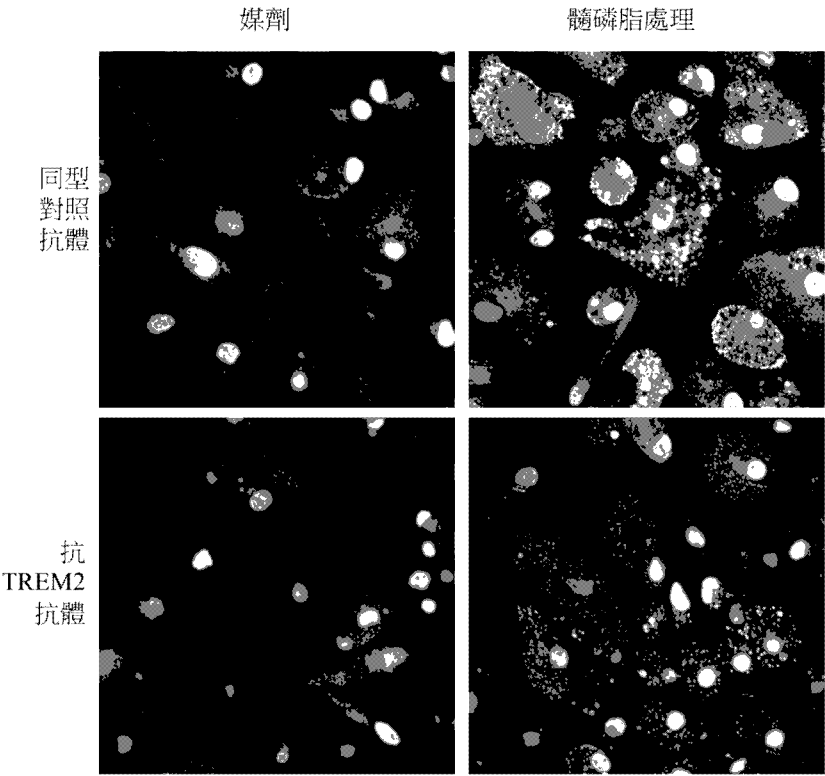
抗 T R E M 2 抗體及其使用方法

(57)摘要

在一個態樣中，提供了特異性結合到人類骨髓細胞表現觸發性受體 2 (TREM2) 蛋白之抗體。在一些實施例中，該抗體降低可溶性 TREM2 (sTREM2) 之水準。在一些實施例中，該抗體增強 TREM2 活性。

In one aspect, antibodies that specifically bind to a human triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) protein are provided. In some embodiments, the antibody decreases levels of soluble TREM2 (sTREM2). In some embodiments, the antibody enhances TREM2 activity.

指定代表圖：



【圖 8A】



I879756

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗 TREM2 抗體及其使用方法

【英文發明名稱】ANTI-TREM2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

THEREOF

【中文】

在一個態樣中，提供了特異性結合到人類骨髓細胞表現觸發性受體 2 (TREM2) 蛋白之抗體。在一些實施例中，該抗體降低可溶性 TREM2 (sTREM2) 之水準。在一些實施例中，該抗體增強 TREM2 活性。

【英文】

In one aspect, antibodies that specifically bind to a human triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) protein are provided. In some embodiments, the antibody decreases levels of soluble TREM2 (sTREM2). In some embodiments, the antibody enhances TREM2 activity.

【指定代表圖】圖 8A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗 TREM2 抗體及其使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-TREM2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 骨髓細胞表現觸發性受體 2 (TREM2)為在小神經膠質細胞上表現且據信在調控吞噬作用、細胞存活、及促炎性細胞因子產生方面起作用的跨膜受體。TREM2 之突變已在神經退化性疾病中得到鑑別，該等神經退化性疾病包括阿茲海默氏病、Nasu-Hakola 病、帕金森氏病、肌萎縮側索硬化症、及額顳葉型癡呆。另外，在患有阿茲海默氏病或額顳葉型癡呆且具有 TREM2 突變之患者的腦脊髓液中已報道可溶性 TREM2 (sTREM2)的經改變水準。

【0002】 需要調節 TREM2 活性或 sTREM2 水準之治療劑。

【發明內容】

【0003】 在第一態樣中，提供了特異性結合到人類骨髓細胞表現觸發性受體 2 (TREM2)之經分離抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，特異性結合到 TREM2 之抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其包含序列 GFSIEDFYIH (SEQ ID NO:29)；
- (b) CDR-H2 序列，其包含序列 W-I-D-P-E-β₆-G-β₈-S-K-Y-A-P-K-F-Q-G (SEQ ID NO:47)，其中 β₆ 為 N 或 Q 且 β₈ 為 D 或 E；
- (c) CDR-H3 序列，其包含序列 HADHGNYGSTMDY (SEQ ID NO:31)；
- (d) CDR-L1 序列，其包含序列 HASQHINWLS (SEQ ID NO:32)；
- (e) CDR-L2 序列，其包含序列 KASNLHT (SEQ ID NO:33)；及

(f) CDR-L3 序列，其包含序列 QQGQTYPR T (SEQ ID NO:34)。

【0004】 在一些實施例中，CDR-H2 序列選自 SEQ ID NO:30、39、41 及 43。

【0005】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含：

(a) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:30 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(b) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:39 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(c) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:41 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(d) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:43 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3。

【0006】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:27、35、37、38、40、42、44、45 及 46 中之任一者具有至少 85%序列一致性的 V_H 序列。在一些實施例中，V_H 序列與 SEQ ID NO:27 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H 序列與 SEQ ID NO:27 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例

中，V_H序列包含 SEQ ID NO:27。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:42 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:42 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列包含 SEQ ID NO:42。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:45 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:45 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列包含 SEQ ID NO:45。

【0007】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性的 V_L序列。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:28 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:28 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列包含 SEQ ID NO:28。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:36 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:36 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列包含 SEQ ID NO:36。

【0008】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:27 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:28 之 V_L；或
- (b) 包含 SEQ ID NO:35 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (c) 包含 SEQ ID NO:37 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (d) 包含 SEQ ID NO:38 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (e) 包含 SEQ ID NO:40 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (f) 包含 SEQ ID NO:42 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (g) 包含 SEQ ID NO:44 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (h) 包含 SEQ ID NO:45 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L；或
- (i) 包含 SEQ ID NO:46 之 V_H序列及包含 SEQ ID NO:36 之 V_L。

【0009】 在一些實施例中，特異性結合到 TREM2 之抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其包含序列 G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S (SEQ ID NO:48)，其中 α_6 為 D 或 N；
- (b) CDR-H2 序列，其包含序列 V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49)，其中 β_5 為 K 或 R； β_6 為 A 或 P； β_8 為 G 或 A； β_{11} 為 A 或 T；且 β_{12} 為 G 或 D；
- (c) CDR-H3 序列，其包含序列 γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:50)，其中 γ_1 為 A 或 T；且 γ_4 為 T 或 S；
- (d) CDR-L1 序列，其包含序列 Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51)，其中 δ_{10} 為 N 或 T；
- (e) CDR-L2 序列，其包含序列 WMSTRAS (SEQ ID NO:8)；及
- (f) CDR-L3 序列，其包含序列 Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T (SEQ ID NO:52)，其中 ϕ_6 為 Y 或 F。

【0010】 在一些實施例中，CDR-H1 序列選自 SEQ ID NO:4 及 12 中之任一者。在一些實施例中，CDR-H2 序列選自 SEQ ID NO:5、13 及 25 中之任一者。在一些實施例中，CDR-H3 序列選自 SEQ ID NO:6、14 及 17 中之任一者。在一些實施例中，CDR-L1 序列選自 SEQ ID NO:7 及 23 中之任一者。在一些實施例中，CDR-L3 序列選自 SEQ ID NO:9 及 18 中之任一者。

【0011】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ

ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(b) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(c) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(d) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(e) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:6 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；或

(f) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:12 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:13 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:14 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；或

(g) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3。

【0012】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26 及 79 中之任一者具有至少 85%序列一致性的 V_H序列。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:15 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:15 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列包含 SEQ ID NO:15。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:24 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:24 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列包含 SEQ ID NO:24。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:79 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列與 SEQ ID NO:79 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_H序列包含 SEQ ID NO:79。

【0013】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:3、11、16、20、22 及 68 中之任一者具有至少 85%序列一致性的 V_L序列。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:16 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:16 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列包含 SEQ ID NO:16。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:22 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:22 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列包含 SEQ ID NO:22。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:68 具有至少 90%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列與 SEQ ID NO:68 具有至少 95%序列一致性。在一些實施例中，V_L序列包含 SEQ ID NO:68。

【0014】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:15 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:16 之 V_L ；或
- (b) 包含 SEQ ID NO:19 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (c) 包含 SEQ ID NO:21 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (d) 包含 SEQ ID NO:19 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (e) 包含 SEQ ID NO:79 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (f) 包含 SEQ ID NO:24 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (g) 包含 SEQ ID NO:26 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (h) 包含 SEQ ID NO:24 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (i) 包含 SEQ ID NO:26 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (j) 包含 SEQ ID NO:2 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:3 之 V_L ；或
- (k) 包含 SEQ ID NO:10 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:11 之 V_L ；或
- (l) 包含 SEQ ID NO:24 之 V_H 序列及包含 SEQ ID NO:68 之 V_L 。

【0015】 在一些實施例中，特異性結合到 TREM2 之抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其包含 SEQ ID NO:4、12 及 29 中任一者之胺基酸序列；
- (b) CDR-H2 序列，其包含 SEQ ID NO:5、13、25、30、39、41 及 43 中任一者之胺基酸序列；
- (c) CDR-H3 序列，其包含 SEQ ID NO:6、14、17 及 31 中任一者之胺基酸序列；
- (d) CDR-L1 序列，其包含 SEQ ID NO:7、23 及 32 中任一者之胺基酸序列；
- (e) CDR-L2 序列，其包含 SEQ ID NO:8 及 33 中任一者之胺基酸序列；及
- (f) CDR-L3 序列，其包含 SEQ ID NO:9、18 及 34 中任一者之胺基酸序列。

【0016】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:6 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；或
- (b) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或
- (c) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或
- (d) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或
- (e) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或
- (f) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:12 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:13 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:14 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ

ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；

(g) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:30 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(h) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:39 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(i) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:41 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(j) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:43 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(k) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3。

【0017】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、27、35、37、38、40、42、44、45、46 及 79 中之任一者具有至少 85%序列一致性的重鏈可變區。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含與 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、28、36 及 68 中之任一者具有至少 85%序列一致性的重鏈可變區。

【0018】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 與 SEQ ID NO:2 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:3 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (b) 與 SEQ ID NO:10 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:11 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (c) 與 SEQ ID NO:15 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:16 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (d) 與 SEQ ID NO:19 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (e) 與 SEQ ID NO:21 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (f) 與 SEQ ID NO:19 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (g) 與 SEQ ID NO:79 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (h) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或

- (i) 與 SEQ ID NO:26 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (j) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (k) 與 SEQ ID NO:26 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (l) 與 SEQ ID NO:27 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:28 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (m) 與 SEQ ID NO:35 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (n) 與 SEQ ID NO:37 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (o) 與 SEQ ID NO:38 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (p) 與 SEQ ID NO:40 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (q) 與 SEQ ID NO:42 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (r) 與 SEQ ID NO:44 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (s) 與 SEQ ID NO:45 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或

(t) 與 SEQ ID NO:46 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或

(u) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:68 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列。

【0019】 在一些實施例中，特異性結合到 TREM2 之抗體或其抗原結合片段所識別之抗原決定基與由選自由以下組成之群的抗體純系識別之抗原決定基相同或基本上相同：純系 CL0020306、純系 CL0020188、純系 CL0020188-1、純系 CL0020188-2、純系 CL0020188-3、純系 CL0020188-4、純系 CL0020188-5、純系 CL0020188-6、純系 CL0020188-7、純系 CL0020188-8、純系 CL0020307、純系 CL0020123、純系 CL0020123-1、純系 CL0020123-2、純系 CL0020123-3、純系 CL0020123-4、純系 CL0020123-5、純系 CL0020123-6、純系 CL0020123-7 及純系 CL0020123-8。

【0020】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段所識別之抗原決定基與由選自由以下組成之群的抗體純系識別之抗原決定基相同或基本上相同：純系 CL0020123、純系 CL0020123-1、純系 CL0020123-2、純系 CL0020123-3、純系 CL0020123-4、純系 CL0020123-5、純系 CL0020123-6、純系 CL0020123-7 及純系 CL0020123-8。在具體實施例中，抗體或抗原結合片段識別 SEQ ID NO:1 中之以下抗原決定基中之一或多者：(i)胺基酸殘基 55-63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70))，(ii)胺基酸 96-107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71))，及(iii)胺基酸殘基 126-129 (VEVL (SEQ ID NO:72))。在另一個態樣中，本揭露提供一種特異性結合到人類 TREM2 之經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段識別包含 SEQ ID NO:1 中之以下抗原決定基中之一或多者或由其組成之抗原決定基：(i)胺基酸殘基 55-63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70))，(ii)胺基酸

96-107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71)), 及(iii)胺基酸殘基 126-129 (VEVL (SEQ ID NO:72))。在一些實施例中, 抗體或其抗原結合片段所識別之抗原決定基與由選自由以下組成之群的抗體純系識別之抗原決定基相同或基本上相同: 純系 CL0020188、純系 CL0020188-1、純系 CL0020188-2、純系 CL0020188-3、純系 CL0020188-4、純系 CL0020188-5、純系 CL0020188-6、純系 CL0020188-7、純系 CL0020188-8、純系 CL0020307 及純系 CL0020306。在具體實施例中, 抗體或抗原結合片段識別 SEQ ID NO:1 中之胺基酸殘基 143-149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69))。在另一個態樣中, 本揭露提供一種特異性結合到人類 TREM2 之經分離抗體或其抗原結合片段, 其中該抗體或其抗原結合片段識別包含 SEQ ID NO:1 中之胺基酸殘基 143-149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69))或由其組成之抗原決定基。

【0021】 在一些實施例中, 如本文所揭示之抗體或抗原結合片段降低可溶性 TREM2 蛋白(sTREM2)之水準。在一些實施例中, 如本文所揭示之抗體或抗原結合片段與參考抗體相比以更好效能結合健康人類 CSF 或獼猴 CSF 中之可溶性 TREM2 蛋白(sTREM2)。在一些實施例中, 參考抗體由選自由以下組成之群之序列組合表示: SEQ ID NO:73 及 74; SEQ ID NO:75 及 76; 及 SEQ ID NO:77 及 78。在一些實施例中, 基本上如實例 11 中所述進行功效檢定。在一些實施例中, 如本文所揭示之抗體或抗原結合片段增強了 TREM2 活性。在一些實施例中, 抗體或其抗原結合片段增強吞噬作用或增強骨髓細胞、小神經膠質細胞或巨噬細胞之遷移、分化、功能、或存活。在一些實施例中, 抗體或其抗原結合片段增強小神經膠質細胞功能而未增加神經炎症。在一些實施例中, 抗體或其抗原結合片段增強了 Syk 磷酸化。在一些實施例中, 抗體或其抗原結合片段在 TREM2 配

體存在下增強 Syk 磷酸化。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段表現出與獼猴 TREM2 蛋白之交叉反應性。

【0022】 在一些實施例中，如本文所揭示之抗體或抗原結合片段為單株抗體。在一些實施例中，如本文所揭示之抗體或抗原結合片段為嵌合抗體。在一些實施例中，如本文所揭示之抗體或抗原結合片段為人源化抗體。在一些實施例中，如本文所揭示之抗體或抗原結合片段為完全人類抗體。在一些實施例中，如本文所揭示之抗體或抗原結合片段為 Fab、F(ab')₂、scFv、或二價 scFv。

【0023】 在另一態樣中，本揭露提供抗體或其抗原結合片段，其與如本文所揭示之經分離抗 TREM2 抗體競爭結合到人類 TREM2 蛋白。

【0024】 在另一態樣中，本揭露提供醫藥組成物，其包含特異性結合到 TREM2 之如本文所揭示的抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。

【0025】 在另一態樣中，本揭露提供套組，其包含：特異性結合到 TREM2 之如本文所揭示的抗體或抗原結合片段或包含抗 TREM2 抗體或抗原結合片段之醫藥組成物；及其使用說明書。

【0026】 在另一態樣中，本揭露提供治療受試者之神經退化性疾病的方法。在一些實施例中，該方法包含向該受試者投與如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段或包含如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段之醫藥組成物。

【0027】 在一些實施例中，神經退化性疾病選自由以下組成之群：阿茲海默氏病、原發性年齡相關 tau 蛋白病、進行性核上性麻痺(PSP)、額顳葉型癡呆、額顳葉型癡呆伴與染色體 17 相關之帕金森症、嗜銀顆粒性癡呆、肌萎縮側索硬化症、肌萎縮側索硬化症/關島型帕金森氏症-癡呆綜合症(ALS-PDC)、皮質基底核退化症、慢性創傷性腦病、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳擊員癡呆、

具有鈣化之擴散性神經原纖維纏結、唐氏症候群、家族性英國型癡呆、家族性丹麥型癡呆、格施謝三氏症(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、球狀神經膠 tau 蛋白病、瓜達洛普帕金森氏病伴癡呆(Guadeloupean parkinsonism with dementia)、瓜達洛普 PSP、哈-斯二氏病(Hallevorden-Spatz disease)、遺傳性彌漫性腦白質病伴癡呆(HDLS)、杭丁頓氏病、包涵體肌炎、多系統萎縮症、肌強直性營養不良、Nasu-Hakola 病、神經原纖維纏結佔優性癡呆、C 型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease type C)、蒼白球-腦橋-黑質變性(pallido-ponto-nigral degeneration)、帕金森氏病、皮克氏病(Pick's disease)、腦炎後帕金森氏症、朊病毒蛋白大腦澱粉樣血管病、進行性皮層下神經膠瘤病、亞急性硬化性全腦炎、及僅纏結性癡呆。

【0028】 在又另一態樣中，本揭露提供降低患有神經退化性疾病之受試者之 sTREM2 水準的方法。在一些實施例中，該方法包含向該受試者投與如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段或包含如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段之醫藥組成物。

【0029】 在又另一態樣中，本揭露提供增強患有神經退化性疾病之受試者之 TREM2 活性的方法。在一些實施例中，該方法包含向該受試者投與如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段或包含如本文所揭示之抗 TREM2 抗體或抗原結合片段之醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

【0030】 圖 1 包括表示示範性抗 TREM2 抗體與表現 TREM2 之 HEK 細胞上之表面 TREM2 的結合的代表性流動式細胞測量術直方圖。

【0031】 圖 2 包括藉由原代人類巨噬細胞中示範性抗 TREM2 抗體所進行之 pSyk 信號活化的代表性劑量反應曲線。實心黑色圓圈(●)表示抗 TREM2 抗體，且空心白色圓圈(○)表示同型對照。

【0032】 圖 3A 及圖 3B 包括在用示範性抗 TREM2 抗體預處理 5 分鐘(圖 3A)或 24 小時(圖 3B)、隨後以脂質囊泡給予且評定細胞中之脂質體反應之後人類 iPSC 小神經膠質細胞中 pSyk 信號活化之代表性劑量反應曲線。

【0033】 圖 4 包括在表現人類 TREM2/DAP12 之 Jurkat NFAT 細胞中響應於示範性抗 TREM2 抗體之刺激而產生的 NFAT-螢光素酶報道基因活性的代表性劑量反應曲線。實心黑色圓圈(●)表示抗 TREM2 抗體，且空心白色圓圈(○)表示同型對照。

【0034】 圖 5 示出人類巨噬細胞中響應於以示範性抗 TREM2 抗體進行之處理所得的細胞存活的代表性劑量反應曲線。

【0035】 圖 6 示出隨著示範性抗 TREM2 抗體之抗 TREM2 抗體濃度變化之代表性可溶性 TREM2 水準(sTREM2)。

【0036】 圖 7 為指示以示範性抗 TREM2 抗體處理之人類巨噬細胞中每個細胞之平均 pHrodo 螢光強度的長條圖。

【0037】 圖 8A 為在以髓磷脂處理、隨後與示範性抗 TREM2 抗體或同型對照一起培育之 iPSC 小神經膠質細胞中脂質積聚之代表性顯微術影像。

【0038】 圖 8B 為在圖 8A 中攝影之 iPSC 小神經膠質細胞之尼羅紅染色(指示脂質積聚)的代表性長條圖。

【0039】 圖 8C-8F 包括示出在以髓磷脂處理、隨後與示範性抗 TREM2 抗體一起培育之 iPSC 小神經膠質細胞中膽固醇酯種類(圖 8C 及 8E)及三酸甘油酯脂

質種類(圖 8D 及 8F)之定量水準的長條圖。圖 8E 及 8F 表示在與示範性抗 TREM2 抗體一起培育前包括髓磷脂廓清(washout)步驟之 iPSC 小神經膠質細胞的資料。

【0040】 圖 9 包括示範性抗 TREM2 抗體之代表性小鼠血漿藥物動力學概況。

【0041】 圖 10A 及圖 10B 包括示出注射到 TREM2 cDNA KI (*huTrem2^{KI/KI}*)小鼠中之示範性抗 TREM2 抗體在小鼠血漿中之總可溶性 TREM2 (sTREM2) (圖 10A)及經抗體結合 TREM2 (圖 10B)的變化的長條圖。

【0042】 圖 11A 及圖 11B 包括示範性人源化及序列經優化抗 TREM2 抗體在 HEK 細胞中對人類 TREM2 之劑量反應結合曲線。

【0043】 圖 12A 及圖 12B 包括在 HEK293-H6 細胞中藉由示範性人源化及序列經優化抗 TREM2 抗體產生之 pSyk 信號活化之劑量反應曲線。

【0044】 圖 13 示出人類巨噬細胞中響應於以示範性人源化及序列經優化抗 TREM2 抗體進行之處理所得的細胞存活的劑量反應曲線。

【0045】 圖 14A 及 14B 包括 iPSC 小神經膠質細胞中響應於以示範性人源化及序列經優化抗 TREM2 抗體進行之處理所得的脂質清除率的劑量反應曲線。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0046】 本申請案主張 2019 年 2 月 20 日申請之美國臨時申請案第 62/808,141 號之優先權，該申請案之揭露內容據此出於所有目的以全文引用的方式併入。

I. 介紹

【0047】 TREM2 為在小神經膠質細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、及蝕骨細胞之細胞表面上表現之跨膜受體。不局限於特定理論，據信在配體結合後，TREM2 與跨膜轉接蛋白、DNAX 活化蛋白 12 (DAP12)形成信號傳導複合物，其進而藉由蛋白激酶 SRC 進行酪胺酸磷酸化。據信經活化 TREM2/DAP12 信號傳導複合

物藉由募集及磷酸化激酶諸如 Syk 激酶介導細胞內信號傳導。TREM2/DAP12 信號傳導調節細胞諸如小神經膠質細胞及巨噬細胞之活性諸如吞噬作用、細胞生長及存活、促炎症性細胞介素分泌、及遷移。TREM2 經歷經調控膜內蛋白水解，其中膜相關全長 TREM2 藉由金屬蛋白酶 ADAM10 裂解成自細胞上脫落之 sTREM2 部分及藉由 γ 分泌酶進一步降解之經膜保留 C 端片段。在患有阿茲海默氏病或額顳葉型癡呆且具有 TREM2 突變之患者中已報道 sTREM2 之經改變水準。另外，TREM2 突變與功能改變諸如吞噬作用受損及小神經膠質細胞功能減小相關。

【0048】 如以下實例部分詳述，已生成特異性結合到人類 TREM2 且調節 TREM2/DAP12 信號傳導複合物之一或多種下游功能的抗體。因此，在一個態樣中，本揭露提供抗 TREM2 抗體及其抗原結合片段。因此，在一個態樣中，本揭露提供抗 TREM2 抗體及其抗原結合部分。

【0049】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強 TREM2 活性，例如增強吞噬作用或增強髓細胞、小神經膠質細胞或巨噬細胞之分化、功能、或存活。因此，在另一態樣中，提供了增強例如患有神經退化性疾病之受試者之 TREM2 活性的方法。

【0050】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體減少 sTREM2 脫落。因此，在另一態樣中，提供了減少例如患有神經退化性疾病之受試者之 sTREM2 水準的方法。

II. 定義

【0051】 如本文所用，除非內容另外明確說明，否則單數形式「一個/種 (a/an)」、及「該/該等(the)」包括複數指示物。因此，例如，提及「一種抗體」視情況包括兩種或更多種此類分子之組合，及其類似者。

【0052】 如本文所用，用語「約」及「大約」當用於修飾以數值或範圍指定之量時指示該數值以及熟悉此項技藝者已知之與該值的合理偏差例如 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、或 $\pm 5\%$ 係處於所述值之預期含義內。

【0053】 如本文所用，用語「TREM2 蛋白」係指由基因 *TREM2* 編碼之骨髓細胞表現觸發性受體 2。如本文所用，「TREM2 蛋白」係指任何脊椎動物之天然(亦即，野生型) TREM2 蛋白，該脊椎動物諸如但不限於人類人類、非人靈長類動物(例如，石蟹獼猴)、齧齒動物(例如，小鼠、大鼠)、及其他哺乳動物。在一些實施例中，TREM2 蛋白為具有 UniprotKB 登錄號 Q9NZC2 (SEQ ID NO:1)中鑑別之序列的人類 TREM2 蛋白。

【0054】 如本文所用，用語「抗 TREM2 抗體」係指特異性結合到 TREM2 蛋白(例如，人類 TREM2)之抗體。

【0055】 如本文所用，用語「抗體」係指具有經由其可變區特異性結合到抗原之免疫球蛋白折疊之蛋白質。該用語包括完整多株抗體、完整單株抗體、單鏈抗體、多特異性抗體諸如雙特異性抗體、單特異性抗體、單價抗體、嵌合抗體、人源化抗體、及人類抗體。如本文所用，用語「抗體」亦包括經由其可變區保留結合特異性之抗體片段，包括但不限於 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、及二價 scFv。抗體可含有經分類為 κ 或 λ 之輕鏈。抗體可含有經分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 之重鏈，其又分別定義免疫球蛋白類別 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE。

【0056】 示範性免疫球蛋白(抗體)結構單元包括四聚體。每個四聚體主要由兩對相同的多肽鏈組成，每一對具有一個「輕鏈」(約 25 kD)及一個「重鏈」(約 50-70 kD)。各鏈之 N 末端界定主要負責抗原識別的具有約 100 個至 110 個或 110 個以上胺基酸之可變區。用語「可變輕鏈」(VL)及「可變重鏈」(VH)分別係指此等輕鏈及重鏈。

【0057】 用語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中來源於種系可變(V)基因、多樣性(D)基因、或連接(J)基因(而非來源於恆定(C μ 及 C δ)基因區段)且賦予抗體結合到抗原之特異性的域。通常，抗體可變區包含四個保守性「構架」區，其穿插有三個高變「互補決定區」。

【0058】 用語「互補決定區」或「CDR」係指各鏈中之三個高變區，其中斷經輕鏈及重鏈可變區建立之四個構架區。CDR 主要負責抗體與抗原之抗原決定基的結合。各鏈之 CDR 通常稱為 CDR1、CDR2、及 CDR3，其自 N 端開始依次編號，且通常亦由特定 CDR 所位於的鏈鑑別。因此，V_H CDR3 或 CDR-H3 位於存在該 CDR 之抗體之重鏈的可變區，而 V_L CDR1 或 CDR-L1 為來自存在該 CDR 之抗體之輕鏈之可變區的 CDR1。

【0059】 不同輕鏈或重鏈之「構架區」或「FR」在物種內為相對保守的。抗體之構架區為組成型輕鏈及重鏈之經組合框架區，其用於在三維空間內定位且比對 CDR。構架序列可獲自包括生殖系抗體基因序列之公共 DNA 資料庫或已公佈參考。舉例而言，人類重鏈及輕鏈可變區基因之種系 DNA 序列可見於人類及小鼠序列之「VBASE2」生殖系可變基因序列。

【0060】 CDR 及構架區之胺基酸序列可使用此項技術中之各種熟知定義來確定，例如 Kabat、Chothia、國際 ImMunoGeneTics 資料庫(IMGt)、AbM、及已觀測抗原接觸(observed antigen contacts) (「Contact」)。在一些實施例中，CDR 根據 Contact 定義來確定。參見 MacCallum 等人, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996)。在一些實施例中，CDR 藉由 Kabat、Chothia、及/或 Contact CDR 定義來確定。

【0061】 用語「抗原結合部分」或「抗原結合片段」在本文中可互換使用且係指抗體之保留經由其可變區特異性結合到抗原(例如，TREM2 蛋白)之能力的一或多種片段。抗原結合片段之實例包括但不限於 Fab 片段(由 VL、VH、CL

及 CH1 域組成之單價片段)、F(ab')₂ 片段(在鉸鏈區處包含由二硫橋連接之兩個 Fab 片段之二價片段)、單鏈 Fv (scFv)、經二硫鍵連接之 Fv (dsFv)、互補決定區 (CDR)、V_L(輕鏈可變區)、及 V_H(重鏈可變區)。

【0062】 用語「抗原決定基」係指抗體之 CDR 所特異性結合之抗原的區域或區且可包括若干個胺基酸或若干個胺基酸之部分，例如 5 或 6 個或更多個，例如 20 或更多個胺基酸或彼等胺基酸之部分。舉例而言，在靶為蛋白質時，抗原決定基可包含連續胺基酸(例如，線性抗原決定基)或來自蛋白質之藉由蛋白質折疊而彼此接近的不同部分的胺基酸(例如，不連續或構象抗原決定基)。在一些實施例中，抗原決定基在一個胺基酸處(例如，在絲胺酸或蘇胺酸殘基處)經磷酸化。

【0063】 如本文所用，如參考抗 TREM2 抗體使用之片語「識別抗原決定基」意指抗體 CDR 與抗原(亦即，TREM2 蛋白)在該抗原決定基或該抗原之含有該抗原決定基的部分處相互作用或特異性結合。

【0064】 如本文所用，用語「多特異性抗體」係指包含二或更多個不同抗原結合部分之抗體，其中各抗原結合部分包含識別不同抗原之不同可變區，或者抗體之經由其可變區結合到二或更多個不同抗原之片段或部分。如本文所用，用語「雙特異性抗體」係指包含兩個不同抗原結合部分之抗體，其中各抗原結合部分包含識別不同抗原之不同可變區，或者抗體之經由其可變區結合到兩個不同抗原之片段或部分。

【0065】 「單株抗體」係指由細胞之單一純系或單一細胞株產生且由一級胺基酸序列相同之抗體分子組成或基本上由該等抗體分子組成之抗體。

【0066】 「多株抗體」係指自異質抗體群體獲得之抗體，其中該群體中之不同抗體結合到抗原之不同抗原決定基。

【0067】 「嵌合抗體」係指如下抗體分子，其中恆定區或其部分經改變、置換或交換，使得抗原結合位點(亦即，可變區、CDR、或其部分)連接至具有不同或經改變類別、效應子功能及/或種類之恆定區，或者其中可變區或其部分經具有不同或經改變抗原特異性之可變區(例如 CDR 及來自不同種類之構架區)改變、置換或交換。在一些實施例中，嵌合抗體為包含來自一個來源或種類(例如，小鼠)之可變區及來源於第二來源或種類(例如，人類)之恆定區的單株抗體。用於產生嵌合抗體之方法係此項技術中描述的。

【0068】 「人源化抗體」為來源於非人類來源(例如鼠類)之嵌合免疫球蛋白，其在 CDR 外部含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列。一般而言，人源化抗體將包含至少一個(例如兩個)抗原結合可變區，其中 CDR 區基本上對應於非人類免疫球蛋白之彼等者且構架區基本上對應於人類免疫球蛋白序列之彼等者。人源化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人類免疫球蛋白序列。抗體人源化之方法為此項技術中已知的。

【0069】 「人類抗體」或「完全人類抗體」為具有人類重鏈及輕鏈序列之抗體，該等序列通常來源於人類生殖系基因。在一些實施例中，抗體由人類細胞、由利用人類抗體庫之非人類動物(例如，經遺傳工程化以表現人類抗體序列之基因轉殖小鼠)、或由噬菌體展示平台產生。

【0070】 術語「特異性結合」係指與分子(例如，抗體或其抗原結合部分)結合到另一個抗原決定基或非靶標化合物(例如，結構不同的抗原)相比，其以更大親和力、更大親合力、及/或更大與樣品中抗原決定基或靶標之持續時間結合到該抗原決定基或靶標。在一些實施例中，特異性結合到抗原決定基或靶標之抗體(或其抗原結合部分)為以比其他抗原決定基或非靶標化合物大至少 5 倍，例如至少 6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍、100 倍、1,000 倍、10,000

倍、或更大親和力結合到抗原決定基或靶標之抗體(或其抗原結合部分)。如本文所用，用語「特異性結合」、「特異性結合到」特定抗原決定基或靶標、或對與特定抗原決定基或靶標「有特異性」可藉由例如對其所結合之抗原決定基或靶標具有以下平衡解離常數 K_D 之分子來表現： 10^{-4} M 或更小，例如 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、或 10^{-12} M。技術人員將認識到，特異性結合到來自一種物種之靶標(例如，TREM2 蛋白)之抗體亦可特異性結合到該靶標之直系同源物(例如，TREM2 蛋白)。

【0071】 用語「結合親和力」在本文中用於係指兩個分子之間，例如抗體(或其抗原結合部分)與抗原之間的非共價相互作用之強度。因此，舉例而言，除非上下文另外指明或由上下文能夠清晰，否則該用語可係指抗體(或其抗原結合部分)與抗原之間的 1:1 相互作用。結合親和力可藉由量測平衡解離常數(K_D)，該平衡解離常數係指解離速率常數(k_d ，時間⁻¹)除以締合速率常數(k_a ，時間⁻¹ M⁻¹)。 K_D 可藉由例如使用表面電漿子共振(SPR)方法，例如 Biacore™系統；動力排阻檢定，諸如 KinExA®；及生物層干涉術(例如，使用 ForteBio® Octet 平台)量測複合物形成動力學及解離來確定。如本文所用，「結合親和力」不僅包括正式結合親和力，諸如反映抗體(或其抗原結合部分)與抗原之間的 1:1 相互作用之彼等者，而且亦包括表觀親和力，其 K_D 值經計算且可反映酸結合。

【0072】 如本文所用，用語「交叉反應」係指抗體結合到除了產生該抗體之抗原以外的抗原之能力。在一些實施例中，交叉反應性係指抗體結合到除了產生該抗體之抗原以外的來自另一物種的抗原之能力。作為非限制性實例，如本文所述且針對人類 TREM2 肽產生之抗 TREM2 抗體可以表現出與來自不同物種(例如，猴或小鼠)之 TREM2 肽或蛋白之交叉反應性。

【0073】 如參考核酸或蛋白(例如，抗體)所用之用語「經分離」表示該核酸或蛋白基本上不含在自然狀態下與其締合之其他細胞組分。純度及均質性通常使用分析化學技術諸如電泳(例如，聚丙烯醯胺凝膠電泳)或層析(例如，高效液相層析)來確定。在一些實施例中，經分離核酸或蛋白(例如，抗體)為至少 85%純的、至少 90%純的、至少 95%純的、或至少 99%純的。

【0074】 用語「胺基酸」係指天然存在及合成之胺基酸，以及以與天然存在之胺基酸類似之方式起作用的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸係由遺傳密碼編碼之彼等胺基酸，以及後來經修飾之彼等胺基酸，例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及 O-磷酸絲胺酸。天然存在之 α -胺基酸包括但不限於丙胺酸(Ala)、半胱胺酸(Cys)、天冬胺酸(Asp)、麩胺酸(Glu)、苯丙胺酸(Phe)、甘胺酸(Gly)、組胺酸(His)、異白胺酸(Ile)、精胺酸(Arg)、離胺酸(Lys)、白胺酸(Leu)、甲硫胺酸(Met)、天冬醯胺(Asn)、脯胺酸(Pro)、麩醯胺(Gln)、絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)、纈胺酸(Val)、色胺酸(Trp)、酪胺酸(Tyr)、及其組合。天然存在之 α -胺基酸的立體異構物包括但不限於 D-丙胺酸(D-Ala)、D-半胱胺酸(D-Cys)、D-天冬胺酸(D-Asp)、D-麩胺酸(D-Glu)、D-苯丙胺酸(D-Phe)、D-組胺酸(D-His)、D-異白胺酸(D-Ile)、D-精胺酸(D-Arg)、D-離胺酸(D-Lys)、D-白胺酸(D-Leu)、D-甲硫胺酸(D-Met)、D-天冬醯胺(D-Asn)、D-脯胺酸(D-Pro)、D-麩醯胺(D-Gln)、D-絲胺酸(D-Ser)、D-蘇胺酸(D-Thr)、D-纈胺酸(D-Val)、D-色胺酸(D-Trp)、D-酪胺酸(D-Tyr)、及其組合。「胺基酸類似物」係指具有與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構(亦即， α 碳結合至氫、羧基、胺基及 R 基團)的化合物，例如，高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基銻。此等類似物具有經修飾 R 基團(例如，正白胺酸)或經修飾肽骨架，但是保持與天然存在之胺基酸相同的基本化學結構。「胺基酸模擬物」係指具有不同於胺基酸之一般化學結構之結構，

但是以與天然存在之胺基酸類似之方式起作用的化合物。胺基酸在本文中係以其通常已知之三字母符號或以 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會所推薦之單字母符號來提及。

【0075】 用語「多肽」及「肽」在本文中可互換用於指示單鏈中之胺基酸殘基之聚合物。該等用語適用於一或多個胺基酸殘基為相應天然存在之胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。胺基酸聚合物可包含完整 L-胺基酸、完整 D-胺基酸、或 L 胺基酸及 D 胺基酸之混合物。

【0076】 如本文所用，用語「蛋白質」係指多肽或單鏈多肽之二聚物(亦即，兩個)或多聚物(亦即，三個或更多個)。蛋白質之單鏈多肽可藉由共價鍵(例如二硫鍵)或非共價相互作用連接。

【0077】 用語「聚核苷酸」及「核酸」可互換地係指具有任何長度之核苷酸鏈，且包括 DNA 及 RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基、及/或其類似物，或可藉由 DNA 或 RNA 聚合酶併入鏈中之任何基質。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。本文涵蓋之多核苷酸之實例包括單鏈及雙鏈 DNA、單鏈及雙鏈 RNA，及具有單鏈及雙鏈 DNA 及 RNA 之混合物之雜合分子。

【0078】 用語「保守取代」及「保守突變」係指導致一胺基酸被可經分類為具有類似特徵之另一胺基酸取代的改變。以此方式定義之保守性胺基酸組之類別的實例可包括：「帶電荷/極性組」，包括 Glu (麩胺酸或 E)、Asp (天冬胺酸或 D)、Asn (天冬醯胺或 N)、Gln (麩醯胺或 Q)、Lys (離胺酸或 K)、Arg (精胺酸或 R)、及 His (組胺酸或 H)；「芳族組」，包括 Phe (苯丙胺酸或 F)、Tyr (酪胺酸或 Y)、Trp (色胺酸或 W)、及(組胺酸或 H)；及「脂族組」，包括 Gly (甘胺酸

或 G)、Ala (丙胺酸或 A)、Val (纈胺酸或 V)、Leu (白胺酸或 L)、Ile (異白胺酸或 I)、Met (甲硫胺酸或 M)、Ser (絲胺酸或 S)、Thr (蘇胺酸或 T)、及 Cys (半胱胺酸或 C)。在各組內，亦可鑑別亞組。舉例而言，帶電荷或極性胺基酸之組可細分成包括以下之子組：「帶正電荷子組」，包含 Lys、Arg 及 His；「帶負電荷子組」，包含 Glu 及 Asp；及「極性子組」，包含 Asn 及 Gln。在另一個實例中，芳族或環狀組可細分成包括以下之子組：「氮環子組」，包含 Pro、His 及 Trp；及「苯基子組」，包含 Phe 及 Tyr。在另一實例中，脂族組可細分成子組，例如「脂族非極性子組」，包含 Val、Leu、Gly、及 Ala；及「脂族弱極性子組」，包含 Met、Ser、Thr、及 Cys。保守突變之類別之實例包括對以上子組內之胺基酸的胺基酸取代，諸如但不限於：以 Lys 取代 Arg 或相反，使得可以保持正電荷；以 Glu 取代 Asp 或相反，使得可以保持負電荷；以 Ser 取代 Thr 或相反，使得可以保持游離-OH；及以 Gln 取代 Asn 或相反，使得可以保持游離-NH₂。在一些實施例中，疏水性胺基酸取代天然存在之疏水性胺基酸，例如在活性位點中，以保護疏水性。

【0079】 在兩種或更多種多肽序列之情形下，用語「一致」或「一致性」百分比係指兩個或更多個序列或子序列當使用序列比較算法或藉由手動比對及目視檢查所量測來比較及比對比較窗口或指定區域之最大一致性時，為相同的或在指定區域內具有指定百分比之相同胺基酸殘基，例如至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更大百分比。

【0080】 關於多肽之序列比較，通常一個胺基酸序列充當與候選序列進行比較之參考序列。比對可使用熟悉此項技藝者可用之各種方法進行，例如可視比對或使用可公開獲得之軟體使用已知算法實現最大比對。此類程式包括 BLAST

程式、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.)或 Megalign (DNASTAR)。用於比對以實現最大比對之參數可藉由熟悉此項技藝者確定。關於出於此應用目的而進行之多肽序列的序列比較，使用用於以默認參數比對兩種蛋白序列之 BLASTP 算法標準蛋白 BLAST。

【0081】 如本文所用，用語「受試者」、「個體」、及「患者」係指哺乳動物，包括但不限於人類、非人靈長類動物、齧齒動物(例如，大鼠、小鼠、及豚鼠)、兔子、牛、豬、馬、及其他哺乳動物種類。在一個實施例中，受試者、個體、或患者為人類。

【0082】 用語「治療(treating/treatment)」及類似用語在本文中通常用於意指獲得所要藥理學及/或生理學作用。「治療(treating/treatment)」可係指成功治療或減輕神經退化性疾病(例如，阿茲海默氏病或本文所述之另一種神經退化性疾病)之標記，包括任何客觀或主觀參數，諸如緩解、緩和、患者存活改善、存活時間或存活率增加、症狀減輕或者使得疾病更為患者所耐受、變性或衰弱速率減慢、或改善患者之身體或心理健康。症狀之治療或減輕可以基於客觀或主觀參數。治療作用可與未接受治療之一個體或一組個體相比較，或者與治療前或治療期間之不同時間點的同一患者相比較。

【0083】 用語「醫藥學上可接受之賦形劑」係指在生物學上或藥理學上相容以用於人類或動物之非活性藥物成分，諸如但不限於緩衝劑、載劑、或防腐劑。

【0084】 如本文所用，藥劑(例如，如本文所述之抗體)之「治療量」或「治療有效量」為藥劑的治療、減輕、去除或減少受試者之疾病症狀之嚴重性的量。藥劑(例如，如本文所述之抗體)之「治療量」可改善患者存活、增加存活時間或存活率、減少症狀、使得損傷、疾病、或病狀(例如，神經退化性疾病)更耐受、減慢變性或衰弱速率、或改善患者身體或心理健康。

【0085】 用語「投與」係指將藥劑、化合物、或組成物遞送到所要生物作用位點之方法。該等方法包括但不限於局部遞送、非經腸遞送、靜脈內遞送、經皮遞送、肌肉內遞送、鞘內遞送、結腸遞送、直腸遞送、或腹膜內遞送。在一個實施例中，如本文所述之抗體係靜脈內投與。

【0086】 用語「對照」或「對照值」係指參考值或基線值。適當對照可由熟習此項技術者確定。在一些情況下，對照值可相對於同一受試者或實驗內之基線確定，例如在以抗 TREM2 抗體治療前所獲得之 sTREM2 量測值可為同一受試者中 sTREM2 水準之治療後量測值之對照值。在其他情況下，對照值可相對於對照受試者(例如，健康對照或疾病對照)或對照受試者群體中之平均值(例如，健康對照或疾病對照，例如 10、20、50、100、200、500、1000 或更多位對照受試者之群體)確定，例如，在基線下或治療後之受試者 sTREM2 水準的量測值可與健康對照值相比較。

III. 抗 TREM2 抗體

【0087】 在一個態樣中，提供特異性結合到 TREM2 蛋白之抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抗體特異性結合到人類 TREM2 蛋白。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體針對 TREM2 相對於其他 TREM 樣受體(例如，TREM1)具有選擇性。

【0088】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為包含如本文所揭示之一或多個互補決定區(CDR)、重鏈可變區、及/或輕鏈可變區序列之抗體。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含如本文所揭示之一或多個 CDR、重鏈可變區、及/或輕鏈可變區序列且進一步包含如本文所揭示之一或多種功能特徵，例如增強 TREM2 活性(例如，增強吞噬作用或增強細胞諸如骨髓細胞、小神經膠質細胞或巨噬細胞之分化、功能、或存活)之抗體或降低 sTREM2 水準之抗體。

抗 TREM2 抗體序列

【0089】 在一些實施例中，抗 TREM2 或其抗原結合片段包含來源於本文所述之以下抗 TREM2 抗體中之任一者的重鏈序列或其部分及/或輕鏈序列或其部分：純系 CL0020306、純系 CL0020188、純系 CL0020307、及純系 CL0020123。該等純系之 CDR、重鏈可變區、及輕鏈可變區胺基酸序列陳述於非正式序列表中。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為嵌合抗體。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體係人源化及/或親和力成熟抗體。

【0090】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自由以下組成之群的一或多個 CDR：

- (a) 與 SEQ ID NO:4、12、及 29 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:4、12、及 29 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之重鏈 CDR1 (CDR-H1)序列；
- (b) 與 SEQ ID NO:5、13、25、30、39、41、及 43 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:5、13、25、30、39、41、及 43 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之重鏈 CDR2 (CDR-H2)序列；
- (c) 與 SEQ ID NO:6、14、17、及 31 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:6、14、17、及 31 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之重鏈 CDR3 (CDR-H3)序列；
- (d) 與 SEQ ID NO:7、23、及 32 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:7、23、及 32 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之輕鏈 CDR1 (CDR-L1)序列；

(e) 與 SEQ ID NO:8 及 33 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:8 及 33 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之輕鏈 CDR2 (CDR-L2)序列；及

(f) 與 SEQ ID NO:9、18、及 34 中任一者之胺基酸序列具有至少 90%序列一致性或相對於 SEQ ID NO:9、18、及 34 中任一者之胺基酸序列具有多至兩個胺基酸取代之輕鏈 CDR3 (CDR-L3)序列。

【0091】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(a)-(f)中之二、三、四、五、或全部六者。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(a)之 CDR-H1、(b)之 CDR-H2、及(c)之 CDR-H3。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(d)之 CDR-L1、(e)之 CDR-L2、及(f)之 CDR-L3。在一些實施例中，具有多至兩個胺基酸取代之 CDR 相對於參考序列具有一個胺基酸取代。在一些實施例中，具有多至兩個胺基酸取代之 CDR 相對於參考序列具有兩個胺基酸取代。在一些實施例中，多至兩個胺基酸取代係保守取代。

【0092】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自由以下組成之群的一或多個 CDR：

(a) CDR-H1 序列，其包含 SEQ ID NO:4、12 及 29 中任一者之胺基酸序列；

(b) CDR-H2 序列，其包含 SEQ ID NO:5、13、25、30、39、41 及 43 中任一者之胺基酸序列；

(c) CDR-H3 序列，其包含 SEQ ID NO:6、14、17 及 31 中任一者之胺基酸序列；

(d) CDR-L1 序列，其包含 SEQ ID NO:7、23 及 32 中任一者之胺基酸序列；

(e) CDR-L2 序列，其包含 SEQ ID NO:8 及 33 中任一者之胺基酸序列；及

(f) CDR-L3 序列，其包含 SEQ ID NO:9、18 及 34 中任一者之胺基酸序列。

【0093】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(a)-(f)中之二、三、四、五、或全部六者。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(a)之 CDR-H1、(b)之 CDR-H2、及(c)之 CDR-H3。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含(d)之 CDR-L1、(e)之 CDR-L2、及(f)之 CDR-L3。

【0094】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含：

(a) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:6 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；或

(b) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(c) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(d) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(e) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID

NO:23 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(f) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:12 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:13 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:14 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3；或

(g) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:30 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(h) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:39 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(i) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:41 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3；或

(j) 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:43 之 CDR-H2、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1、包含胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3。

【0095】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、27、35、37、38、40、42、44、45、46、及 79 中之任一者具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列一致性之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、27、35、37、38、40、42、44、45、46、及 79 中之任一者的重鏈可變區。

【0096】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、28、36、及 68 中之任一者具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、28、36 及 68 中之任一者的輕鏈可變區。

【0097】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含：含有與 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、27、35、37、38、40、42、44、45、46、及 79 中之任一者具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%序列一致性之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、28、36、及 68 中任一者具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%序列一致性之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 包含：含有胺基酸序列 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、27、35、37、38、40、42、44、45、46、及 79 中之任一者的重鏈可變區，及含有胺基酸 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、28、36、及 68 中之任一者的輕鏈可變區。

【0098】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含：

- (a) 與 SEQ ID NO:2 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:3 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (b) 與 SEQ ID NO:10 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:11 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (c) 與 SEQ ID NO:15 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:16 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (d) 與 SEQ ID NO:19 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (e) 與 SEQ ID NO:21 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (f) 與 SEQ ID NO:19 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (g) 與 SEQ ID NO:79 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (h) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (i) 與 SEQ ID NO:26 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:20 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (j) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (k) 與 SEQ ID NO:26 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或

- (l) 與 SEQ ID NO:27 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:28 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (m) 與 SEQ ID NO:35 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (n) 與 SEQ ID NO:37 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (o) 與 SEQ ID NO:38 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (p) 與 SEQ ID NO:40 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (q) 與 SEQ ID NO:42 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (r) 與 SEQ ID NO:44 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (s) 與 SEQ ID NO:45 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (t) 與 SEQ ID NO:46 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列；或
- (u) 與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性之 V_H 序列及與 SEQ ID NO:68 具有至少 85%序列一致性之 V_L 序列。

【0099】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含由本文所揭示之共通序列所涵蓋之一或多個序列。作為非限制性實例，共通序列可藉由比對來自相同(或類似)生殖系之抗體的重鏈或輕鏈序列(例如 CDR)來鑑別。在一些實施例中，共通序

列可由含有具有相同(或類似)長度且/或具有至少一個高度類似 CDR(例如，高度類似 CDR3)之序列的抗體生成。在一些實施例中，可比對且比較該等抗體中之此類序列以鑑別保守性胺基酸或基序(亦即，其中序列之改變可改變蛋白功能)及/或其中序列出現變化之區域(亦即，其中序列之變化不可能顯著影響蛋白功能)。或者，共通序列可藉由比對結合到相同或類似(例如重疊)抗原決定基之抗體的重鏈或輕鏈序列(例如 CDR)來鑑別以確定保守性胺基酸或基序(亦即，其中序列之變化可改變蛋白功能)及在序列比對中出現變化之區域(亦即，其中序列之變化不可能顯著影響蛋白功能)。在一些實施例中，可鑑別抗體之識別與如本文所揭示之抗 TREM2 抗體相同或類似之抗原決定基之一或多個共通序列。示範性共通序列包括 SEQ ID NO:47-52。在共通序列 SEQ ID NO:47-52 中，大寫字母表示在經比對序列(例如，經比對 CDR 序列)中絕對保守之胺基酸殘基，而「X」或希臘字母(例如，「 α 」、「 β 」、「 γ 」、「 δ 」、「 ϵ 」或「 ϕ 」)表示在經比對序列內並非絕對保守之胺基酸殘基。將瞭解的是，當選擇胺基酸插入在由「X」或希臘字母標記之位置時，在一些實施例中，該胺基酸選自經比對序列中之相應位置處可見之彼等胺基酸。

純系 CL0020123 及 CL0020123 之變異體

【0100】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其包含序列 GFSIEDFYIH (SEQ ID NO:29)；
- (b) CDR-H2 序列，其包含序列 W-I-D-P-E- β_6 -G- β_8 -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G (SEQ ID NO:47)，其中 β_6 為 N 或 Q 且 β_8 為 D 或 E；
- (c) CDR-H3 序列，其包含序列 HADHGNYGSTMDY (SEQ ID NO:31)；
- (d) CDR-L1 序列，其包含序列 HASQHINVWLS (SEQ ID NO:32)；
- (e) CDR-L2 序列，其包含序列 KASNLHT (SEQ ID NO:33)；及

(f) CDR-L3 序列，其包含序列 QQGQTYPR (SEQ ID NO:34)。

【0101】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:30、39、41 和 43 之 CDR-H2 序列。

【0102】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:27、35、37、38、40、42、44、45、及 46 中之任一者具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:27、35、37、38、40、42、44、45、及 46 中之任一者的重鏈可變區。

【0103】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:28 及 36 中之任一者具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:28 及 36 中之任一者的輕鏈可變區。

【0104】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:30 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3 序列。

【0105】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:27 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO: 27 之重鏈可變區。

【0106】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:28 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區。

【0107】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:27 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:28 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:27 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區。

【0108】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:29、30、及 31 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:27 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:32、33、及 34 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:28 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0109】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29、30、31、32、33、及 34 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:27 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

【0110】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:43 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3 序列。

【0111】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:42 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:42 之重鏈可變區。

【0112】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區。

【0113】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:42 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:42 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區。

【0114】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:29、43、及 31 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:42 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:32、33、及 34 之輕鏈

CDR1-3 且與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0115】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29、43、31、32、33、及 34 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:42 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

【0116】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:41 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:31 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:32 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:33 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:34 之 CDR-L3 序列。

【0117】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:45 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:45 之重鏈可變區。

【0118】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區。

【0119】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:45 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，

抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:45 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區。

【0120】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:29、41、及 31 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:45 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:32、33、及 34 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:36 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0121】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:29、41、31、32、33、及 34 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:45 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

純系 *CL0020188*、*CL0020306*、*CL0020307*、及 *CL0020188* 之變異體

【0122】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其包含序列 G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S (SEQ ID NO:48)，其中 α_6 為 D 或 N；
- (b) CDR-H2 序列，其包含序列 V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49)，其中 β_5 為 K 或 R； β_6 為 A 或 P； β_8 為 G 或 A； β_{11} 為 A 或 T；且 β_{12} 為 G 或 D；
- (c) CDR-H3 序列，其包含序列 γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:50)，其中 γ_1 為 A 或 T；且 γ_4 為 T 或 S；
- (d) CDR-L1 序列，其包含序列 Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51)，其中 δ_{10} 為 N 或 T；

(e) CDR-L2 序列，其包含序列 WMSTRAS (SEQ ID NO:8)；及

(f) CDR-L3 序列，其包含序列 Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T (SEQ ID NO:52)，其中 ϕ_6 為 Y 或 F。

【0123】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:4 和 12 之 CDR-H1 序列。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:5、13 和 25 之 CDR-H2 序列。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:6、14 和 17 之 CDR-H3 序列。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:7 和 23 之 CDR-L1 序列。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含選自 SEQ ID NO:9 和 18 之 CDR-L3。

【0124】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID No:2、10、15、19、21、24、26、及 79 中之任一者具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:2、10、15、19、21、24、26、及 79 中之任一者的重鏈可變區。

【0125】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID No:3、11、16、20、22、及 68 中之任一者具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:3、11、16、20、22、及 68 中之任一者的輕鏈可變區。

純系 CL0020188 及 CL0020188 之變異體

【0126】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID

NO:7 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3 序列。

【0127】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:15 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO: 15 之重鏈可變區。

【0128】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:16 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:16 之輕鏈可變區。

【0129】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:15 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:16 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:15 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:16 之輕鏈可變區。

【0130】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:4、5、及 17 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:15 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7、8、及 18 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:16 具有至少 85%

序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0131】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:5、17、7、8、及 18 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:15 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:16 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

【0132】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3 序列。

【0133】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:79 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:79 之重鏈可變區。

【0134】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區。

【0135】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:79 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，

抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:79 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區。

【0136】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:4、5、及 17 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:79 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:23、8、及 18 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0137】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4、5、17、23、8、及 18 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:79 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

【0138】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3 序列。

【0139】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區。

【0140】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的

輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區。

【0141】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區。

【0142】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:4、25、及 17 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:23、8、及 18 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:22 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0143】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4、25、17、23、8、及 18 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:22 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

【0144】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3 序列。

【0145】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區。

【0146】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:68 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:68 之輕鏈可變區。

【0147】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:68 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:68 之輕鏈可變區。

【0148】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:4、25、及 17 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:24 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7、8、及 9 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:68 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、95%、或 97%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0149】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4、25、17、7、8、及 9 之重鏈 CDR1-3 及輕

鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:68 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

純系 CL0020306

【0150】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:6 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3 序列。

【0151】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:2 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO: 2 之重鏈可變區。

【0152】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:3 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:3 之輕鏈可變區。

【0153】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:2 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:3 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:2 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:3 之輕鏈可變區。

【0154】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:4、5、及 6 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:2 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7、8、及 9 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:3 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0155】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:4、5、6、7、8、及 9 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:2 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:3 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

純系 CL0020307

【0156】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:12 之 CDR-H1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:13 之 CDR-H2 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:14 之 CDR-H3 序列、含有胺基酸序列含有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1 序列、含有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 序列、及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:9 之 CDR-L3 序列。

【0157】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:10 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO: 10 之重鏈可變區。

【0158】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:11 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:11 之輕鏈可變區。

【0159】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有與 SEQ ID NO:10 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的重鏈可變區，及含有與 SEQ ID NO:11 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之胺基酸序列的輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:10 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:11 之輕鏈可變區。

【0160】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸 SEQ ID NO:12、13、及 14 之重鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:10 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體包含含有分別具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7、8、及 9 之輕鏈 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:11 具有至少 85%序列一致性(例如，至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性)之輕鏈可變區。

【0161】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為與如本文所述之抗體(例如，包含分別含有胺基酸序列 SEQ ID NO:12、13、14、7、8、及 9 之重鏈 CDR1-3 及輕鏈 CDR1-3 之抗體或包含含有胺基酸序列 SEQ ID NO:10 之重鏈可變區及含有胺基酸序列 SEQ ID NO:11 之輕鏈可變區之抗體)競爭結合之抗體。

抗 TREM2 抗體之結合特徵

【0162】 在一些實施例中，如本文所述之特異性結合到 TREM2 蛋白之抗體結合到細胞(例如，內源性表現 TREM2 之原代細胞或細胞株，諸如人類巨噬細胞，

或經工程化以表現 TREM2 之原代細胞或細胞株，例如，如以下實例部分所述) 上表現之 TREM2。在一些實施例中，特異性結合到如本文所述之 TREM2 蛋白之抗體結合到經純化或重組 TREM2 蛋白或其部分或包含 TREM2 或其部分之嵌合蛋白(例如，包含 TREM2 之 Fc-融合蛋白或包含 TREM2 胞外域之 Fc-融合蛋白)。

【0163】 在一些實施例中，特異性結合到人類 TREM2 蛋白之抗體表現出與另一種類之一或多種其他 TREM2 蛋白之交叉反應性。在一些實施例中，特異性結合到人類 TREM2 蛋白之抗體表現出與石蟹獼猴(「cyno」) TREM2 蛋白之交叉反應性。在一些實施例中，特異性結合到人類 TREM2 蛋白之抗體表現出與小鼠 TREM2 蛋白之交叉反應性。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體表現出與人類 TREM2、cyno TREM2、及小鼠 TREM2 之交叉反應。

【0164】 用於分析結合親和力、結合動力學、及交叉反應性之方法為此項技術中已知的。該等方法包括但不限於固相結合檢定(例如，ELISA 檢定)、免疫沉澱法、表面電漿子共振(例如，Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ))、動力排阻檢定(例如，KinExA®)、流動式細胞測量術、螢光活化細胞分選(FACS)、生物層干涉術(例如，Octet™ (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA))、及西方墨點分析。在一些實施例中，使用 ELISA 確定結合親和力及/或交叉反應性。用於進行 ELISA 檢定之方法為此項技術中已知的，且亦描述於以下實例部分中。在一些實施例中，使用表面電漿子共振(SPR)確定結合親和力、結合動力學、及/或交叉反應性。在一些實施例中，使用動力排阻檢定確定結合親和力、結合動力學、及/或交叉反應性。在一些實施例中，使用生物層干涉術確定結合親和力、結合動力學、及/或交叉反應性。

抗 TREM2 抗體所識別之抗原決定基

【0165】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體識別人類 TREM2 之抗原決定基與如本文所述之抗體純系識別的抗原決定基相同或基本上相同。如本文所用，如參考由如本文所述之抗體純系所識別之抗原決定基使用，用語「基本上相同」意指抗 TREM2 抗體識別之抗原決定基與由如本文所述之抗體純系所識別之抗原決定基相同、或在該抗原決定基內、或與該抗原決定基幾乎相同(例如，與該抗原決定基具有至少 90%序列一致性或相對於該抗原決定基具有一個、兩個、或三個胺基酸取代，例如保守性取代)，或與該抗原決定基具有大量重複(例如，與其具有至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95%重複)。

【0166】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體識別人類 TREM2 之抗原決定基與選自由以下組成之群之抗體純系識別的抗原決定基相同或基本上相同：純系 CL0020306、純系 CL0020188、純系 CL0020307、及純系 CL0020123。

【0167】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體結合到人類 TREM2 之抗原決定基的 TREM2 柄區。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體識別人類 TREM2 之抗原決定基，該抗原決定基包含 SEQ ID NO:1 之殘基 129-172 或殘基 131-169、在該等殘基內、或由該等殘基組成。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體識別人類 TREM2 之抗原決定基，該抗原決定基包含 SEQ ID NO:1 之殘基 129-148、在該等殘基內、或由該等殘基組成。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體識別人類 TREM2 之抗原決定基，該抗原決定基包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸殘基 143-149、在該等殘基內、或由該等殘基組成。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為活化 TREM2/DAP12 信號傳導(例如，藉由誘導激酶諸如 Syk 之磷酸化)且結合到人類 TREM2 之抗原決定基的 TREM2 柄區內的促效劑。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體結合到人類 TREM2 之抗原決定基的 TREM2 柄區且抑制蛋白酶(例如，ADAM17)對 TREM2 之裂解。

【0168】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體結合到人類 TREM2 之抗原決定基的 TREM2 Ig 可變(IgV)域內。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為活化 TREM2/DAP12 信號傳導(例如，藉由誘導激酶諸如 Syk 之磷酸化)且結合到人類 TREM2 之抗原決定基的 TREM2 IgV 域的促效劑。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體結合到人類 TREM2 之抗原決定基，該抗原決定基包含以下一或多者或由以下一或多者組成：(i) SEQ ID NO:1 之胺基酸殘基 55-63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70))，(ii) SEQ ID NO:1 之胺基酸 96-107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71))，及(iii) SEQ ID NO:1 之胺基酸殘基 126-129 (VEVL (SEQ ID NO:72))。

抗 TREM2 抗體之功能特徵

【0169】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體(例如，具有一或多個 CDR、重鏈可變區、及/或輕鏈可變區序列之如所揭示的抗體)在如本文所揭示之一或多種 TREM2 活性方面起作用。舉例而言，在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為調節 sTREM2 蛋白水準(例如，自細胞表面脫落入細胞外樣品之 sTREM2 水準)、調節與 TREM2/DAP12 信號傳導複合物相互作用之激酶(例如，Syk 激酶)之募集或磷酸化、及/或調節信號傳導複合物下游之一或多種活性(諸如吞噬作用、細胞生長、細胞存活、細胞分化、細胞介素分泌、或細胞遷移)之抗體。在一些實施例中，如本文所揭示之抗 TREM2 抗體與參考抗體相比以更好效能結合健康人類 CSF 或獼猴 CSF 中之可溶性 TREM2 蛋白(sTREM2)。在一些實施例中，參考抗體由選自由以下組成之群之序列組合表示：SEQ ID NO:73 及 74；SEQ ID NO:75 及 76；及 SEQ ID NO:77 及 78。在一些實施例中，基本上如實例 11 中所述進行功效檢定。

【0170】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強由配體誘導之一或多種 TREM2 活性(例如，本文所述之彼等者)。在一些實施例中，配體係脂質配體。

TREM2 脂質配體之實例包括但不限於 1-棕櫚醯基-2-(5'-側氧基-戊醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(POVPC)、2-花生四烯酸甘油(2-AG)、7-酮基膽固醇(7-KC)、24(S)羥基膽固醇(24OHC)、25(S)羥基膽固醇(25OHC)、27-羥基膽固醇(27OHC)、醯基肉鹼(AC)、烷基醯基甘油磷酸膽鹼(PAF)、 α -半乳糖基神經醯胺(KRN7000)、雙(單醯基甘油)磷酸酯(BMP)、心磷脂(CL)、神經醯胺、神經醯胺-1-磷酸酯(C1P)、膽固醇酯(CE)、膽固醇磷酸酯(CP)、二醯基甘油 34:1 (DG 34:1)、二醯基甘油 38:4 (DG 38:4)、二醯基甘油焦磷酸酯(DGPP)、二氫神經醯胺(DhCer)、二氫神經鞘磷脂(DhSM)、醚磷脂醯膽鹼(PCe)、游離膽固醇(FC)、半乳糖基神經醯胺(GalCer)、半乳糖基神經鞘胺醇(GalSo)、神經節苷脂 GM1、神經節苷脂 GM3、葡萄糖基神經節苷脂(GlcSo)、Hank 氏平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)、Kdo2-脂質 A (KLA)、乳糖基神經醯胺(LacCer)、溶血體烷基醯基甘油磷酸膽鹼(LPAF)、溶血磷脂酸(LPA)、溶血卵磷脂(LPC)、溶血磷脂醯乙醇胺(LPE)、溶血磷脂醯甘油(LPG)、溶血磷脂醯肌醇(LPI)、溶血神經鞘磷脂(LSM)、溶血磷脂醯絲胺酸(LPS)、N-醯基-磷脂醯乙醇胺(NAPE)、N-醯基-絲胺酸(NSer)、經氧化磷脂醯膽鹼(oxPC)、棕櫚酸-9-羥基-硬脂酸(PAHSA)、磷脂醯乙醇胺(PE)、磷脂醯乙醇(PEtOH)、磷脂酸(PA)、磷脂醯膽鹼(PC)、磷脂醯甘油(PG)、磷脂醯肌醇(PI)、磷脂醯絲胺酸(PS)、鞘胺醇、鞘胺醇-1-磷酸酯(Sa1P)、神經鞘磷脂(SM)、神經鞘胺醇、神經鞘胺醇-1-磷酸酯(So1P)、及硫酸腦苷脂。

sTREM2 脫落之調節

【0171】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體改變樣品中之 sTREM2 蛋白水準，例如自細胞表面脫落入細胞外樣品中之 sTREM2 水準。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體降低 sTREM2 水準。

【0172】 在一些實施例中，若經處理樣品中 sTREM2 之量與對照值相比降低至少 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%或更大，則抗 TREM2 抗體降低 sTREM2 水準。在一些實施例中，若經處理樣品中 sTREM2 之量與對照值相比降低至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、或更多倍，則抗 TREM2 抗體降低 sTREM2 水準。在一些實施例中，對照值為未經處理樣品(例如，來自尚未用抗 TREM2 抗體處理之表現 TREM2 細胞之上清液或來自尚未用抗 TREM2 抗體治療之受試者之樣品)或用適當非 TREM2 結合抗體處理之樣品中的 sTREM2 之量。

【0173】 在一些實施例中，用包含流體之樣品量測 sTREM2 脫落，該樣品例如血液、血漿、血清、尿液、或腦脊髓液。在一些實施例中，樣品為腦脊髓液。在一些實施例中，樣品包含來自細胞培養物之上清液(例如，來自內源性表現 TREM2 之原代細胞或細胞株諸如人類巨噬細胞或經工程化以表現 TREM2 之原代細胞或細胞株之上清液，例如，如以下實例部分所述)。

【0174】 在一些實施例中，樣品中 sTREM2 之水準使用免疫檢定來量測。免疫檢定為此項技術中已知的且包括但不限於酶免疫檢定(EIA)，諸如酶多因子免疫檢定(EMIA)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、微粒酶免疫檢定(MEIA)、免疫組織化學(IHC)、免疫細胞化學、毛細管電泳免疫檢定(CEIA)、放射性免疫檢定(RIA)、免疫螢光、化學發光免疫檢定(CL)、及電化學發光免疫檢定(ECL)。在一些實施例中，使用 ELISA 檢定來量測 sTREM2 水準。在一些實施例中，使用如下實例部分所述之 ELISA 檢定來量測 sTREM2 水準。

激酶募集或磷酸化之調節

【0175】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體誘導與 TREM2/DAP12 信號傳導複合物相互作用之激酶(諸如但不限於 Syk、ZAP70、PI3K、Erk、AKT、或 GSK3b)

的磷酸化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體誘導與 TREM2/DAP12 信號傳導複合物相互作用而不阻斷天然 TREM2 配體之結合之激酶的磷酸化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強與 TREM2/DAP12 信號傳導複合物相互作用之激酶的由 TREM2 配體(例如，脂質配體)誘導的磷酸化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體誘導或增強 Syk 之磷酸化。在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中 Syk 磷酸化水準與對照值相比增加至少 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%或更大，則抗 TREM2 體誘導或增強 Syk 磷酸化。在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中 Syk 磷酸化水準與對照值相比增加至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、或更多倍，則抗 TREM2 抗體誘導 Syk 磷酸化。在一些實施例中，對照值為未經處理樣品(例如，包含尚未用抗 TREM2 抗體處理之表現 TREM2 細胞之樣品或來自尚未用抗 TREM2 抗體治療之受試者之樣品)、或已用 TREM2 配體而非抗 TREM2 抗體處理之樣品、或用適當非 TREM2 結合抗體處理之樣品中的 Syk 磷酸化水準。

【0176】 為了偵測及/或量化樣品中之磷酸化(例如，Syk 磷酸化)，在一些實施例中，使用免疫檢定。在一些實施例中，免疫檢定為酶免疫檢定(EIA)、酶多因子免疫檢定(EMIA)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、微粒酶免疫檢定(MEIA)、免疫組織化學(IHC)、免疫細胞化學、毛細管電泳免疫檢定(CEIA)、放射性免疫檢定(RIA)、免疫螢光、化學發光免疫檢定(CL)、或電化學發光免疫檢定(ECL)。在一些實施例中，使用利用放大發光接近均勻檢定(amplified luminescent proximity homogenous assay)(AlphaLISA®, PerkinElmer Inc.)之免疫檢定來偵測及/或量化磷酸化。

【0177】 在一些實施例中，使用包含一或多種細胞，例如一或多種表現 TREM2 細胞(例如，內源性表現 TREM2 之原代細胞或細胞株，諸如人類巨噬細胞或 iPSC 源性小神經膠質細胞，或經工程化以表現 TREM2 之原代細胞或細胞株，例如，如以下實例部分所述)之樣品量測磷酸化。在一些實施例中，樣品包含流體，例如血液、血漿、血清、尿液、或腦脊髓液。在一些實施例中，樣品包含組織(例如，肺、腦、腎、脾、神經組織、或骨骼肌)或來自此組織之細胞。在一些實施例中，樣品包含內源性流體、組織、或細胞(例如，來自人類或非人類受試者)。

吞噬作用之調節

【0178】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強對死細胞碎片、組織碎片、澱粉樣蛋白 β 粒子、或外來物質之吞噬作用。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強吞噬作用而不阻斷天然 TREM2 配體之結合。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強由 TREM2 配體(例如，脂質配體)誘導之吞噬作用。在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中吞噬作用與對照值相比增加至少 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%或更大，則抗 TREM2 抗體增強吞噬作用。在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中吞噬作用與對照值相比增加至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、或更多倍，則抗 TREM2 抗體增強吞噬作用。在一些實施例中，對照值為未經處理樣品、已用 TREM2 配體而非抗 TREM2 抗體處理之樣品、或用適當非 TREM2 結合抗體處理之樣品中的吞噬作用水準。

【0179】 在一些實施例中，使用以經標記受質進行之吞噬作用檢定量測吞噬作用。吞噬作用檢定為此項技術中已知的。在一些實施例中，對包含內源性表現 TREM2 之細胞，諸如人類巨噬細胞或小神經膠質細胞的樣品進行吞噬作用檢

定。在一些實施例中，對包含已經工程化以表現 TREM2 之細胞的樣品進行吞噬作用檢定。在一些實施例中，使用如以下實例部分所述之人類巨噬細胞吞噬作用檢定來量測吞噬作用。

細胞分化、功能、遷移、及存活之調節

【0180】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強細胞遷移、細胞存活、細胞功能、或細胞分化(例如，關於骨髓細胞、巨噬細胞、及小神經膠質細胞，包括 iPSC 源性小神經膠質細胞及疾病相關小神經膠質細胞)。疾病相關小神經膠質細胞及偵測疾病相關小神經膠質細胞之方法描述於 Keren-Shaul 等人, *Cell*, 2017, 169:1276-1290 中。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強一或多種細胞類型(例如，骨髓細胞、巨噬細胞、或小神經膠質細胞)之細胞遷移。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強一或多種細胞類型(例如，骨髓細胞、巨噬細胞、或小神經膠質細胞)之細胞存活。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強一或多種細胞類型(例如，骨髓細胞、巨噬細胞、或小神經膠質細胞)之細胞功能。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強一或多種細胞類型(例如，骨髓細胞、巨噬細胞、或小神經膠質細胞)之細胞分化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強骨髓細胞之遷移、存活、功能、及/或分化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強巨噬細胞之遷移、存活、功能、及/或分化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強小神經膠質細胞之遷移、存活、功能、及/或分化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強小神經膠質細胞活化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強疾病相關小神經膠質細胞之遷移、存活、功能、及/或分化。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強細胞遷移、細胞存活、細胞功能、或細胞分化而不阻斷天然 TREM2 配體之結合。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強由 TREM2 配體(例如，脂質配體)誘導之細胞遷移、細胞存活、細胞功能、或細胞分化。

【0181】 在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中活性(例如，遷移、存活、功能、或分化)水準與對照值相比增加至少 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%或更大，則抗 TREM2 抗體增強吞噬作用細胞遷移、細胞存活、細胞功能、或細胞分化。在一些實施例中，若經抗 TREM2 抗體處理之樣品中活性(例如，遷移、存活、功能、或分化)水準與對照值相比增加至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、或更多倍，則抗 TREM2 抗體增強細胞遷移、細胞存活、細胞功能、或細胞分化。在一些實施例中，對照值為未經處理樣品(例如，尚未用抗 TREM2 抗體處理之樣品)、已用 TREM2 配體而非抗 TREM2 抗體處理之樣品、或用適當非 TREM2 結合抗體處理之樣品中的活性(例如，遷移、存活、功能、或分化)水準。

【0182】 在一些實施例中，使用趨化性檢定量測細胞遷移。趨化性檢定為此項技術中已知的。在一些實施例中，對包含內源性表現 TREM2 之細胞，諸如人類巨噬細胞的樣品進行細胞遷移檢定(例如，趨化性檢定)。在一些實施例中，對包含已經工程化以表現 TREM2 之細胞的樣品進行細胞遷移檢定(例如，趨化性檢定)。在一些實施例中，使用如以下實例部分所述之人類巨噬細胞趨化性檢定來量測細胞遷移。

【0183】 在一些實施例中，使用細胞活力檢定量測細胞存活。細胞活力檢定為此項技術中已知的。在一些實施例中，對包含內源性表現 TREM2 之細胞，諸如人類巨噬細胞的樣品進行細胞存活檢定(例如，細胞活力檢定)。在一些實施例中，對包含已經工程化以表現 TREM2 之細胞的樣品進行細胞存活檢定(例如，細胞活力檢定)。在一些實施例中，使用如以下實例部分所述之人類巨噬細胞活力檢定來量測細胞存活。

【0184】 在一些實施例中，使用對於細胞而言適當之功能檢定量測細胞功能。舉例而言，在一些實施例中，使用吞噬作用檢定(例如，如以下實例部分所述)評估巨噬細胞功能。

【0185】 在一些實施例中，藉由評估內源性表現 TREM2 之細胞分化之能力來量測細胞分化。舉例而言，在一些實施例中，藉由評估巨噬細胞自單核球分化之能力(例如，如以下實例部分所述)來量測細胞分化。

【0186】 在一些實施例中，活體內量測小神經膠質細胞之活化。在一些實施例中，使用 TSPO-PET 攝影量測小神經膠質細胞活化。TSPO-PET 攝影方法為此項技術中已知的。

【0187】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體增強小神經膠質細胞功能，而不增加神經炎症。神經炎症水準可藉由量測細胞介素(例如，炎症性細胞介素)之水準來確定，該等細胞介素諸如但不限於 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-1ra、TGF β 、IL-15、或 IFN- γ 。在一些實施例中，使用免疫檢定量測細胞介素水準，該等免疫檢定例如為酶免疫檢定(EIA)、酶多因子免疫檢定(EMIA)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、微粒酶免疫檢定(MEIA)、免疫組織化學(IHC)、免疫細胞化學、毛細管電泳免疫檢定(CEIA)、放射性免疫檢定(RIA)、免疫螢光、化學發光免疫檢定(CL)、或電化學發光免疫檢定(ECL)。

IV. 抗體之製備

【0188】 在一些實施例中，抗體藉由以用於誘導抗體反應之抗原或抗原混合物免疫一或多隻動物(例如，小鼠、兔、或大鼠)來製備。在一些實施例中，投與抗原或抗原混合物以及佐劑(例如，弗氏佐劑)。在初始免疫後，可投與該抗原或該等抗原之一或多個後續補強注射以提高抗體產生。在免疫後，例如自脾及/或

淋巴組織收穫抗原特異性 B 細胞。為了生成單株抗體，將 B 細胞與骨髓細胞融合，隨後針對抗原特異性進行篩選。製備抗體之方法亦描述於以下實例部分中。

【0189】 編碼所關注抗體之重鏈及輕鏈之基因可自細胞選殖，例如，編碼單株抗體之基因可自融合瘤選殖並且用於產生重組單株抗體。編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因文庫亦可自融合瘤或漿細胞製備。或者，可以使用噬菌體或酵母展示技術來鑑別特異性結合到所選抗原之抗體及 Fab 片段。抗體亦可製成為雙特異性的，亦即能夠識別兩種不同抗原。抗體亦可為雜結合物，例如兩個共價連接抗體或免疫毒素。

【0190】 抗體可使用任何數目的表現系統產生，該等表現系統包括原核及真核表現系統。在一些實施例中，表現系統為哺乳動物細胞表型，諸如融合瘤或 CHO 細胞表現系統。許多此類系統可廣泛獲自商業供應商。在抗體包含 V_H 及 V_L 區之實施例中， V_H 及 V_L 區可使用單一載體，例如以雙順反子表現單元或在不同啟動子控制下來表現。在其他實施例中， V_H 及 V_L 區可使用單獨載體表現。如本文所述之 V_H 或 V_L 區可視情況在 N 端包含甲硫胺酸。

【0191】 在一些實施例中，抗體為嵌合抗體。用於製得嵌合抗體之方法為此項技術中已知的。舉例而言，可製成嵌合抗體，其中來自一種物種諸如小鼠之抗原結合區(重鏈可變區及輕鏈可變區)融合至另一物種諸如人類之效應子區(恆定域)。作為另一個實例，可製成「類別轉換」嵌合抗體，其中抗體之效應子區經不同免疫球蛋白類別或子類別之效應子區取代。

【0192】 在一些實施例中，抗體為人源化抗體。一般而言，非人類抗體經人源化以便降低其免疫原性。人源化抗體通常包含一或多個非人類(例如，源自小鼠可變區序列)可變區(例如，CDR)或其部分及可能一些非人類構架區或其部分，且進一步包含一或多個源自人類抗體序列之恆定區。用於使非人類抗體人

源化之方法為此項技術中已知的。基因轉殖小鼠或其他生物體諸如其他哺乳動物可用於表現人源化或人類抗體。使抗體人源化之其他方法包括例如可變域表面重整、CDR 移植、移植特異性決定殘基(SDR)、引導選擇、及構架改組。

【0193】 作為人源化之替代方案，可生成完全人類抗體。作為非限制性實例，可產生如下基因轉殖動物(例如小鼠)，它們一旦免疫便能產生人類抗體之完整庫而不產生內源性免疫球蛋白。例如，已描述嵌合及生殖系突變小鼠中抗體重鏈接合區(JH)基因的同型缺失使內源性抗體產生受到完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該種生殖系突變小鼠中，由此將會導致在抗原激發時產生人類抗體。作為另一個實例，可藉由基於融合瘤之方法，諸如藉由使用用於生成產生人類單株抗體之細胞株的原代人類 B 細胞來產生人類抗體。

【0194】 亦可使用噬菌體展示或酵母展示技術來產生人類抗體。在噬菌體展示中，可變重鏈及可變輕鏈基因庫在噬菌體展示載體中經擴增且表現。在一些實施例中，抗體文庫為自人類來源擴增之天然庫。在一些實施例中，抗體文庫為藉由選殖重鏈及輕鏈序列且重組以生成具有不同抗原特異性之較大抗體池來製成之合成文庫。噬菌體通常展示抗體片段(例如，Fab 片段或 scFv 片段)，然後針對其與所關注抗原之結合進行篩選。

【0195】 在一些實施例中，生成抗體片段(諸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、V_H、或 V_{HH})。已開發用於產生抗體片段之各種技術。傳統上，該等片段經由蛋白水解消化完整抗體來獲得。然而，此等片段現可直接使用重組宿主細胞產生。例如，抗體片段可自抗體噬菌體文庫分離。或者，可直接自大腸桿菌細胞回收 Fab'-SH 片段且化學偶合以形成 F(ab')₂ 片段。根據另一種方法，F(ab')₂ 片段可直接從重組宿主細胞培養物中單離。用於產生抗體片段之其他技術將為熟悉此項技藝者顯而易知的。

【0196】 在一些實施例中，抗體或抗體片段經結合至另一分子，例如聚乙二醇(PEG 化)或血清白蛋白，以提供經延長之活體外半衰期。

【0197】 在一些實施例中，提供包含如本文所述之抗 TREM2 抗體(或其抗原結合片段)的多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之抗體。在一些實施例中，多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)對 TREM2 具有結合特異性且對至少一個其他抗原具有結合特異性。在一些實施例中，多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)結合到兩個不同 TREM2 抗原決定基。在一些實施例中，多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)能夠在細胞表面處誘導 TREM2 聚集。用於使用共焦 FRET 顯微術量測受體聚集之例示性方法描述於 Wallrabe 等人, *Biophys. J.*, 2003, 85:559-571。製成多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)之方法包括但不限於在宿主細胞中重組共表現兩對重鏈及輕鏈、「孔中結(knob-into-hole)」工程化、分子內三聚化、及將抗體片段融合至另一抗體之 N 端或 C 端，例如串聯可變域。

V. 核酸、載體、及宿主細胞

【0198】 在一些實施例中，使用重組方法製備如本文所揭示之抗 TREM2 抗體。因此，在一些態樣中，本揭露提供包含編碼任一種如本文所述之抗 TREM2 抗體(例如，本文所述之 CDR、重鏈可變區、及輕鏈可變區中之任一或多個)之核酸序列的經分離核酸；包含此類核酸之載體；引入該等核酸以用於複製編碼抗體之核酸且/或表現該等抗體之宿主細胞。

【0199】 在一些實施例中，多核苷酸(例如，經分離多核苷酸)包含編碼如本文所述之抗體或其抗原結合部分(例如，如以上題為「抗 TREM2 抗體序列」之部分所述)之核苷酸序列。在一些實施例中，多核苷酸包含編碼以下非正式序列表中揭示之一或多個胺基酸序列(例如，CDR、重鏈、或輕鏈序列)的核苷酸序列。

在一些實施例中，多核苷酸包含編碼與以下非正式序列中所揭示之序列(例如 CDR、重鏈、或輕鏈序列)具有至少 85% 序列一致性(例如，至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 序列一致性)之胺基酸序列的核苷酸序列。在一些實施例中，如本文所述之多核苷酸可操作連接至異源核酸，例如異源啟動子。

【0200】 含有編碼本揭露之抗體之多核苷酸或其片段的適合載體包括選殖載體及表現載體。雖然所選之選殖載體可根據預期使用之宿主細胞而改變，有用選殖載體通常具有自我複製能力，可具有特定限制性內切核酸酶之單一靶標，且/或可攜帶可用於選擇含有該載體之純系的標記物的基因。實例包括質體及細菌病毒，例如 pUC18、pUC19、Bluescript (例如 pBS SK+) 及其衍生物、mpl8、mpl9、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌體 DNA、及穿梭載體諸如 pSA3 及 pAT28。該等及許多其他選殖載體可獲自商業供應商，諸如 BioRad、Stratagene、及 Invitrogen。

【0201】 表現載體通常為含有本揭露之核酸的可複製多核苷酸構築體。表現載體可在宿主細胞中複製，呈遊離體形式或作為染色體 DNA 之整體部分。適合表現載體包括但不限於質體、病毒載體、及任何其他載體，該等病毒載體包括腺病毒、腺相關病毒、逆轉錄病毒。

【0202】 適用於選殖或表現如本文所述之多核苷酸或載體之宿主細胞包括原核或真核細胞。在一些實施例中，宿主細胞為原核細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞。在一些實施例中，宿主細胞為人類細胞，例如人類胚胎腎(HEK)細胞。

【0203】 在另一態樣中，提供製成如本文所述之抗 TREM2 抗體的方法。在一些實施例中，該方法包含在適用於表現抗體之條件下培養如本文所述之宿主細

胞(例如，表現如本文所述之多核苷酸或載體之宿主細胞)。在一些實施例中，隨後自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

VI. 使用抗 TREM2 抗體之治療方法

【0204】 在另一態樣中，提供使用如本文所揭示之抗 TREM2 抗體(例如，如以上部分 III 中所述之抗 TREM2 抗體)之治療方法。在一些實施例中，提供治療神經退化性疾病之方法。在一些實施例中，提供調節一或多種 TREM2 活性(例如，患有神經退化性疾病之受試者中)之方法。

【0205】 在一些實施例中，提供治療神經退化性疾病之方法。在一些實施例中，神經退化性疾病選自由以下組成之群：阿茲海默氏病、原發性年齡相關 tau 蛋白病、進行性核上性麻痺(PSP)、額顳葉型癡呆、額顳葉型癡呆伴與染色體 17 相關之帕金森症、嗜銀顆粒性癡呆、肌萎縮側索硬化症、肌萎縮側索硬化症/關島型帕金森氏症-癡呆綜合症(ALS-PDC)、皮質基底核退化症、慢性創傷性腦病、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳擊員癡呆、具有鈣化之擴散性神經原纖維纏結、唐氏症候群、家族性英國型癡呆、家族性丹麥型癡呆、格施謝三氏症(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、球狀神經膠 tau 蛋白病、瓜達洛普帕金森氏病伴癡呆(Guadeloupean parkinsonism with dementia)、瓜達洛普 PSP、哈-斯二氏病(Hallevorden-Spatz disease)、遺傳性彌漫性腦白質病伴癡呆(HDLS)、杭丁頓氏病、包涵體肌炎、多系統萎縮症、肌強直性營養不良、Nasu-Hakola 病、神經原纖維纏結佔優性癡呆、C 型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease type C)、蒼白球-腦橋-黑質變性、帕金森氏病、皮克氏病(Pick's disease)、腦炎後帕金森氏症、朊病毒蛋白大腦澱粉樣血管病、進行性皮層下神經膠瘤病、亞急性硬化性全腦炎、及僅纏結性癡呆。在一些實施例中，神經退化性疾病為阿茲海默氏病。在一些實施例中，神經退化性疾病為 Nasu-Hakola 病。在一些實施例中，神經退化

性疾病為額顳葉型癡呆。在一些實施例中，神經退化性疾病為帕金森氏病。在一些實施例中，該方法包含向該受試者投與特異性結合到人類 TREM2 蛋白之經分離抗體或其抗原結合片段(例如如本文所述之抗 TREM2 抗體)或包含如本文所述之抗 TREM2 抗體的醫藥組成物。

【0206】 在一些實施例中，如本文所述之抗 TREM2 抗體(或其抗原結合部分或醫藥組成物)用於治療特徵在於 TREM2 之突變的神經退化性疾病。在一些實施例中，特徵在於 TREM2 之突變的神經退化性疾病為阿茲海默氏病，*例如*特徵在於 TREM2 之 R47H 突變的阿茲海默氏病。

【0207】 在一些實施例中，提供調節受試者中(例如，患有神經退化性疾病之受試者中)之一或多種 TREM2 活性之方法。在一些實施例中，該方法包含調節 sTREM2 水準；調節與 TREM2/DAP12 信號傳導複合物相互作用之激酶(*例如*，Syk 激酶)之募集或磷酸化；調節吞噬作用(*例如*，對細胞碎片、澱粉樣蛋白 β 粒子等之吞噬作用)；調節細胞遷移(*例如*，骨髓細胞、巨噬細胞、小神經膠質細胞、及疾病相關小神經膠質細胞之遷移)；及/或調節細胞分化(*例如*，關於骨髓細胞、巨噬細胞、小神經膠質細胞、及疾病相關小神經膠質細胞)。在一些實施例中，提供增強患有神經退化性疾病之受試者中之一或多種 TREM2 活性的方法。在一些實施例中，提供降低患有神經退化性疾病之受試者之 sTREM2 水準的方法。在一些實施例中，調節受試者中之一或多種 TREM2 活性的方法包含向該受試者投與特異性結合到人類 TREM2 蛋白之經分離抗體或其抗原結合部分(例如，如本文所述之抗 TREM2 抗體)或包含如本文所述之抗 TREM2 抗體的醫藥組成物。

【0208】 在一些實施例中，欲治療受試者為人類，*例如*人類成人或人類兒童。

【0209】 在一些實施例中，提供減少患有神經退化性疾病之受試者中之斑塊積聚的方法。在一些實施例中，該方法包含向受試者投與如本文所述之抗體或

醫藥組成物。在一些實施例中，受試者患有阿茲海默氏病。在一些實施例中，受試者為神經退化性疾病之動物模型(例如，5XFAD 或 APP/PS1 小鼠模型)。在一些實施例中，斑塊積聚藉由澱粉樣蛋白斑塊攝影及/或 Tau 攝影，例如使用正電子發射斷層攝影(PET)掃描來量測。在一些實施例中，投與抗 TREM2 抗體使斑塊積聚與基線值(例如，在投與抗 TREM2 抗體前受試者中之斑塊積聚水準)相比減少至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%。

【0210】 在一些實施例中，向受試者投與治療有效量或劑量之抗 TREM2 抗體。可使用每日劑量範圍為約 0.01 mg/kg 至約 500 mg/kg、或約 0.1 mg/kg 至約 200 mg/kg、或約 1 mg/kg 至約 100 mg/kg、或約 10 mg/kg 至約 50 mg/kg。然而，該等劑量可根據若干種因素而變化，該等因素包括所選投與路徑、組成物之調配、患者反應、病狀之嚴重性、受試者體重、及處方醫師之判斷。劑量可隨時間推移按個別患者所要求而增強或減小。在某些情況下，最初向患者給予低劑量，然後增加至患者可耐受之有效劑量。有效量之確定完全在熟習此項技術者之能力範圍內。

【0211】 如本文所述之抗 TREM2 抗體之投與路徑可為經口、腹膜內、經皮、皮下、靜脈內、肌肉內、鞘內、吸入、局部、病灶內、直腸、支氣管內、經鼻、經黏膜、腸內、眼部或經耳遞送、或此項技術中已知之任何其他方法。在一些實施例中，抗體係經口、靜脈內或腹膜內投與。

【0212】 在一些實施例中，向受試者投與抗 TREM2 抗體(及視情況另一種治療劑)延長時間段，例如達至少 30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350 日或更長時間。

VII. 醫藥組成物及套組

【0213】 在另一個態樣中，提供包含特異性結合到人類 TREM2 蛋白之抗體之醫藥組成物及套組。在一些實施例中，該等醫藥組成物及套組係用於治療神經退化性疾病。在一些實施例中，醫藥組成物及套組係用於調節(例如，增強或抑制)一或多種 TREM2 活性，例如 Syk 磷酸化。在一些實施例中，該等醫藥組成物及套組係用於調節(例如，降低) sTREM2 水準。

醫藥組成物

【0214】 在一些實施例中，提供包含抗 TREM2 抗體或其抗原結合片段之醫藥組成物。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為以上部分 III 中所述之抗體或其抗原結合片段。

【0215】 在一些實施例中，醫藥組成物包含如本文所述之抗 TREM2 抗體且進一步包含一或多種醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑。醫藥學上可接受之載劑包括生理上相容且不干擾或以其他方式抑制活性劑活性之任何溶劑、分散介質、或包衣劑。各種醫藥學上可接受之賦形劑為此項技術中熟知的。

【0216】 在一些實施例中，載劑適用於靜脈內、肌肉內、經口、腹膜內、鞘內、經皮、局部、或皮下投與。醫藥學上可接受之載劑可含有一或多種生理學上可接受之化合物，其例如用於使組成物穩定或增強或減少活性劑之吸收。生理學上可接受之化合物可包括例如碳水化合物，諸如葡萄糖、蔗糖、或葡聚糖；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或麩胱甘肽；螯合劑；低分子量蛋白；減小活性劑之清除率或水解之組成物；或賦形劑；或其他穩定劑及/或緩衝劑。其他醫藥學上可接受之載劑及其調配物為此項技術中熟知的。

【0217】 本文所述之醫藥組成物可以熟悉此項技藝者已知之方式，例如藉助於習知混合、溶解、粒化、糖衣錠製備、乳化、囊封、覆埋或凍乾製程來製造。以下方法及賦形劑僅為示範性的且絕非限制性。

【0218】 對於經口投與，抗 TREM2 抗體可藉由將其與此項技術中熟知之醫藥學上可接受之載劑組合來調配。此類載劑允許將該等化合物調配為錠劑、丸劑、糖衣錠、膠囊、乳液、親脂性及親水性懸浮液、液體、凝膠、糖漿、漿料、懸浮液及其類似者，用於所治療之患者經口攝取。經口使用之醫藥製劑可藉由將化合物與固體賦形劑混合物、視情況研磨所得混合物、且需要時在加入合適助劑後加工顆粒混合物來獲得以獲得錠劑或糖衣丸核心。適合賦形劑包括例如填充劑，諸如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；纖維素製劑，諸如玉米澱粉、小麥澱粉、大米澱粉、馬鈴薯澱粉、明膠、黃芪膠、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、及/或聚乙烷基吡咯啉酮(PVP)。需要時，可添加崩解劑，諸如交聯聚乙烷基吡咯啉酮、瓊脂、或海藻酸或其鹽如海藻酸鈉。

【0219】 抗 TREM2 抗體可經調配用於藉由注射，例如藉由團式注射或連續輸注進行非經腸投藥。對於注射，可藉由將該或該等化合物溶解、懸浮或乳化於水性或非水性溶劑(諸如植物油或其他類似油、合成脂肪酸甘油酯、高級脂肪酸之酯或丙二醇)中；及必要時連同習知添加劑(諸如增溶劑、等張劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑及防腐劑)一起而將其調配為製劑。在一些實施例中，化合物可於水溶液中，例如於生理學上相容之緩衝液(諸如漢克斯氏溶液(Hanks's)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理食鹽水緩衝液)中調配。用於注射之調配物可在添加防腐劑的情況下以單位劑形，例如在安瓿或多劑量容器中呈現。組成物可採用諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。

【0220】 在一些實施例中，抗 TREM2 抗體經製備用於以持續釋放、受控釋放、延長釋放、定時釋放或延遲釋放調配物，例如以含有活性劑之固體疏水性聚合物之可半滲透基質遞送。各種類型的持續釋放材料已得到確立且為熟習此

項技術者熟知。當前延長釋放調配物包括膜包衣錠劑、多微粒或球粒系統、使用親水性或親脂性材料之基質技術及具有成孔賦形劑之基於蠟之錠劑。持續釋放遞送系統可根據其設計在數小時或數日時程內，例如 4、6、8、10、12、16、20、24 小時或日內釋放該等化合物。通常，持續釋放調配物可使用天然存在或合成聚合物來製備，該等聚合物例如聚合乙烷基吡咯啉酮，諸如聚乙烷基吡咯啉酮(PVP)；羧基乙烷基親水性聚合物；疏水性及/或親水性水膠體，諸如甲基纖維素、乙基纖維素、羥丙基纖維素、及羥丙基甲基纖維素；及羧基聚伸甲基。

【0221】 通常，用於活體內投與之醫藥組成物係無菌的。滅菌可根據此項技術中已知之方法完成，該等方法例如熱滅菌、蒸汽滅菌、無菌過濾、或輻射。

【0222】 本揭露之醫藥組成物的劑量及所要藥物濃度可視預期之特定用途而變化。適當劑量或投藥路徑之確定完全在熟悉此項技藝者之技能範圍內。適合劑量亦描述於以上部分 VI 中。

套組

【0223】 在一些實施例中，提供包含抗 TREM2 抗體或其抗原結合片段之套組。在一些實施例中，抗 TREM2 抗體為以上部分 III 中所述之抗體或其抗原結合片段。

【0224】 在一些實施例中，該套組進一步包含一或多種額外治療劑。舉例而言，在一些實施例中，該套組包含如本文所述之抗 TREM2 抗體且進一步包含用於治療神經退化性疾病例如阿茲海默氏病之一或多種額外治療劑。在一些實施例中，治療劑為用於治療神經退化性疾病之認知或行為症狀之藥劑(例如，抗抑鬱藥、多巴胺促效劑、或抗精神病藥)。在一些實施例中，治療劑為神經保護劑(例如，卡比多巴/左旋多巴、抗膽鹼劑、多巴胺激導性劑、單胺氧化酶 B (MAO-B) 抑制劑、兒茶酚-O-甲基轉移酶(COMT)抑制劑、谷胺酸激導性劑、組蛋白去乙

醯酶(HDAC)抑制劑、大麻素、半胱天冬酶抑制劑、抑黑素、消炎劑、激素(例如，雌激素或孕酮)、或維生素)。

【0225】 在一些實施例中，套組包含如本文所述之抗 TREM 抗體且進一步包含一或多種用於量測 sTREM2 水準之試劑。在一些實施例中，套組包含如本文所述之抗 TREM 抗體且進一步包含一或多種用於量測 TREM2 活性(例如，用於量測 Syk 磷酸化)之試劑。

【0226】 在一些實施例中，套組進一步包含含有用於實踐本文所述之方法之指南(亦即，方案)的說明性材料(例如，用於使用套組進行如以上部分 VI 中所述之治療方法的說明書)。雖然說明性材料通常包含書寫或列印材料，但其不限於此類材料。本揭露涵蓋能夠存儲此類說明書且向最終使用者傳達該等說明之任何介質。此類介質包括但不限於電子存儲介質(例如，磁盤、磁帶、磁匣、晶片)、光學介質(例如，CD-ROM)等。此類介質可包括提供此類說明性材料之網際網路網站地址。

VIII. 實例

【0227】 本發明將藉助於特定實例更詳細地加以描述。提供以下實例以僅達成說明性目的，且不欲以任何方式限制本發明。

實例 1. 抗 TREM2 抗體之生成及初始表徵

小鼠 Fc 融合之人類 TREM2 ECD 之重組表現及純化

【0228】 將人類 TREM2 (UniProtKB ID - Q9NZC2)之胞外域(殘基 19-172)亞選殖到具有來自小鼠 IgG κ 鏈 V-III 之分泌信號之 pRK 載體中，將胺基酸 1-20 (UniProtKB ID – P01661)亞選殖在 N 端區域，且將小鼠 Fc 標籤亞選殖在具有 GGGGS (SEQ ID NO:64)之 C 端區域的 TREM2 ECD 與 Fc 之間。

【0229】 使用 Expi293F™表現系統套組根據製造商說明書將經純化質體轉染到 Expi293F™細胞(Thermo Fisher)中。為了抑制經 N-連接聚糖之成熟且減少糖基化異質性，在轉染後立即將高甘露糖苷酶 I 抑制劑幾夫鹼(Sigma)以 1 µg/mL 濃度添加到培養基中。在 6% CO₂加濕氣氛下在 125 rpm 且 37°C回轉式振盪器(Infors HT Multitron)中培育經轉染細胞。在轉染後 16 小時將 ExpiFectamine™ 293 轉染增強子 1 及 2 添加到細胞中，且在轉染後 96 小時收穫培養基上清液。向澄清上清液中補充無 EDTA 蛋白酶抑制劑(Roche)且將其保存於-80°C下。

【0230】 對於 rhTREM2-Fc 分離，將澄清培養基上清液裝載在 HiTrap MabSelect SuRe 蛋白 A 親和管柱(GE Healthcare Life Sciences)上且以 200 mM 精胺酸及 137 mM 琥珀酸鹽緩衝液 pH 5.0 洗滌。在 100 mM QB 檸檬酸鹽緩衝液 pH 3.0 及 50 mM NaCl 中溶離融合蛋白。恰好在溶離後，將 1M Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 添加到蛋白溶液中以中和該 pH。藉由尺寸排阻層析法(SEC)在 Superdex 200 increase 10/300 GL 管柱(GE Healthcare Life Sciences)上分離蛋白聚集物。將 SEC 流動相緩衝液保持在 20 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl 及 50 mM 精胺酸下，其亦為蛋白保存緩衝液。在 AKTA 純或 AKTA Avant 系統(GE Healthcare Life Sciences)上進行全部層析步驟。

His-標記之 TREM2 ECD 之重組表現及純化

【0231】 將 TREM2 (UniProtKB - Q9NZC2)之胞外域(殘基 19-172)亞選殖到具有來自小鼠 Ig κ 鏈 V-III 之分泌信號之 pRK 載體中，將胺基酸 1-20 (UniProtKB ID - P01661)亞選殖在 N 端區域，且將 6X-His tag (SEQ ID NO:65)亞選殖在 C 端區域。藉由測序驗證插入物且進行 maxi 製備型質體純化。

【0232】 使用 Expi293F™表現系統套組根據製造商說明書將經純化質體轉染到 Expi293F™細胞(Thermo Fisher)中。在 6% CO₂加濕氣氛下在 125 rpm 且 37°C

回轉式振盪器(Infors HT Multitron)中培育經轉染細胞。在轉染後 16 小時將 ExpiFectamine™ 293 轉染增強子 1 及 2 添加到細胞中，且在轉染後 96 小時收穫培養基上清液。

【0233】 向收穫培養基中補充 1M 吡啶 pH 8.0 至 10 mM 最終濃度且用孔徑為 0.4 微米之 Nalgene™ Rapid-Flow™ 一次性過濾單元(Thermo Fisher)過濾。將 HisPur™ Ni-NTA 樹脂(Thermo Fisher)用 MQ 水洗滌且用裝載緩衝液(20 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、及 10 mM 吡啶)平衡。使用重力流動方法進行親和純化。將所收穫培養基裝載到樹脂上且將非特異性結合蛋白用補充 50 mM 及 100 mM 吡啶之裝載緩衝液洗滌。將結合的經 His 標記 TREM2 胞外域用 20 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、及 200 mM 吡啶溶離。使用 Amicon 10 kDa 濃縮機濃縮經溶離蛋白且藉由凝膠過濾層析使用 AKTA Avant 系統(GE Healthcare Life Sciences)進一步純化該濃縮蛋白。將該蛋白裝載到以 1x PBS 平衡之 HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences)管柱上且用 1x PBS 作為運行緩衝液溶離及分離。藉由在變性基天然條件下在聚丙烯醯胺(PAGE)凝膠上進行電泳來分析經溶離流份。藉由分析型尺寸排阻層析法及完整蛋白質質量測定進一步表徵經溶離流份。使用來自 PAGE 及分析型表徵之結果來合併高度糖基化蛋白流分且將該對流分等分且保存於-80°C下。

抗體之生成

【0234】 使用標準方案使用 rhTREM2-Fc 免疫原或表現全長 Trem2 受體之 BWZ 細胞免疫齧齒動物(小鼠及大鼠)。貫穿免疫使用不同時間點收集之血清量測效價。使用流動式細胞測量術用 rhTREM2-Fc 免疫原及表現全長 TREM2 之活 BWZ 細胞進行抗原特異性免疫反應之偵測。候選抗體之選擇標準包括齧齒動物

抗體產生及與 TREM2 結合之特異性，如藉由流動式細胞測量術所偵測。自動物免疫組織(包括脾、淋巴結及骨髓)分離抗體分泌細胞。

【0235】 分析單細胞懸浮液以確定所分泌抗體之結合特性。將抗體分泌細胞裝載到微流體裝置且在奈升體積反應室中分離以便能夠使用螢光及基於明場影像之顯微術檢定偵測所分泌抗體(參見例如美國專利第 9,188,593 號)。進行結合檢定，其涉及偵測抗體與抗原塗覆微珠之結合、偵測可溶性經螢光標記抗原與珠粒上固定之抗體之結合、及偵測抗體與細胞表面表現抗原之結合。細胞表面表現抗原包括細胞表面上呈遞之抗原的重組形式及天然形式。

【0236】 使用影像分析鑑別展示陽性螢光信號之腔室，這指示產生具有所要求特性之抗體的單細胞之存在，且回收腔室內容物並在 384 孔盤中裂解(參見例如美國專利第 10,087,408 號)。然後使單細胞裂解物經歷 RT-PCR 以擴增重鏈及輕鏈可變區序列。然後對所得擴增子進行測序以確定來自所選單細胞之配對重鏈及輕鏈可變區的 cDNA 序列。手動檢查所得序列且分析以確定序列多樣性及體細胞高突變。基於篩選資料及序列多樣性選擇序列用於表現。對所選抗體進行測試以證實抗原結合特異性。

抗 TREM2 抗體之初級篩選

【0237】 如下在表現 TREM2 之 HEK 293 細胞、野生型 iPSC、及 TREM2 剔除 iPSC 中進行抗體之初級篩選。

1. 在表現 TREM2 之 HEK 細胞中篩選 TREM2 結合

【0238】 藉由用分別表現野生型人類 TREM2 及 DAP12 及單獨 DAP12 之載體轉染細胞來生成穩定表現人類 TREM2/DAP12 之 HEK 293 細胞株。選擇穩定表現純系，且藉由流動式細胞測量術評估細胞表面 TREM2 表現。使用經 APC 結合之大鼠抗人類/小鼠 TREM2 單株抗體(R&D，目錄號 MAB17291)來偵測表面

TREM2 表現。選擇展示最高野生型 TREM2 表現水準之純系且將其命名為「HEK293-H6」。藉由西方墨點法分析穩定表現 DAP12 之純系，且將所選純系命名為「HEK293-DAP12#1」。

【0239】 藉由 0.05%胰蛋白酶收穫過表現人類 TREM2 (HEK293-H6)之 HEK 293 及過表現 GFP (B5)之 HEK 293 且在 37°C下培育 2 小時。在培育後，將細胞離心且以 FACS 緩衝液(PBS + 0.5% BSA)洗滌兩次。將混合細胞以每種細胞株 10^6 /mL 之密度重懸於具有人類 TruStain FcX 溶液(Biolegend，目錄號 422302)之 FACS 緩衝液中。將混合細胞以 200,000 個細胞/孔接種在 96 孔圓底盤中且在室溫下培育 20 分鐘。在培育後，將細胞離心且與約 0 – 200 nM 劑量效價之抗 TREM2 抗體一起在冰上培育 45 分鐘。在培育後，將細胞離心且用 FACS 緩衝液洗滌三次。然後將細胞與二級抗體(Alexa Fluor 647 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗人類 IgG(H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories，目錄號 109-606-088，1:800 稀釋)一起在冰上培育 30 分鐘。在培育後，將細胞用 FACS 緩衝液洗滌三次，將其重懸浮於 100 μ L FACS 緩衝液中，且藉由流動式細胞測量術(BD FACSCanto II, San Jose, CA)分析，對於各樣品獲得 30,000 個事件。藉由 FlowJo 軟體計算每種細胞之平均螢光強度且將其用於生成劑量反應結合曲線。

【0240】 圖 1 示出結合 HEK293-H6 細胞中之細胞表面受體 TREM2 之示範性抗體的代表性結果。

對 TREM2 依賴性 pSyk 信號傳導之活化的評估

【0241】 在人類巨噬細胞或 HEK293-H6 細胞中使用來自 Perkin-Elmer 之商用 AlphaLisa 檢定量測 TREM2 依賴性 pSyk 信號傳導之活化。

【0242】 對於涉及使用含有 70% DOPC 及 30% POPS 之脂質囊泡的所有實驗，在實驗之兩週內如下製備脂質囊泡：將 7 mg DOPC (1,2-二油鹽基-*sn*-甘油-3-

磷酸膽鹼)及 3 mg POPS (1-棕櫚醯基-2-油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸-L-絲胺酸)合併於玻璃小瓶之氯仿中且在 N₂ 氣體流下乾燥 1-2 小時或直至完全乾燥。將脂質混合物重懸浮於 1 mL HBSS (最終脂質濃度為約 10 mg/mL)且渦旋 2-3 分鐘。隨後，使用以一個 100-nm 孔徑膜構築之 Avanti 微型擠壓機擠壓脂質懸浮液以形成 10 mg/mL 小單層囊泡。

1. 細胞中抗體之給藥

【0243】 檢定前一日，將人類巨噬細胞或 HEK293-H6 細胞分別以 100,000 個細胞/孔或 40,000 個細胞/孔接種在塗覆聚-D-離胺酸之 96 孔盤上。將抗體以 300 nM 開始稀釋到 PBS 中且以 10 點連續稀釋滴定繼續，各點之間有 3 倍稀釋。對於拮抗劑劑量反應曲線，在抗體/PBS 混合物中亦包括 1 mg/mL 最終濃度之含有 70% DOPC 及 30% POPS 之脂質囊泡。使用 Biotek 405/406 盤洗滌器將細胞用 HBSS 洗滌 3 次，之後使用 Hamilton Nimbus 液體處理器每孔添加 50 μ L 抗體/PBS (具有或不具有囊泡)。然後將盤轉移至 37°C 培育器達 5 分鐘。藉由輕擊該盤來去除脂質體/抗體溶液，且使用液體處理器添加含有 1 μ M PMSF 之 40 μ L 裂解緩衝液(Cell Signaling Technologies, CST)。然後將裂解物冷凍在 -80°C 下或立即以 AlphaLisa 檢定進行檢定。

【0244】 製備人類巨噬細胞用於如下檢定。根據 RosetteSep 人類單核球募集混合方案(Stemcell Technologies, REF#15068)自新鮮血液分離人類單核球。將經分離單核球以洗滌緩衝液(PBS+2% FBS)洗滌且重懸浮於 10 mL ACK 裂解緩衝液(ThermoFisher Scientific, 目錄號 A10492)中以裂解紅血細胞。添加二十(20) mL 洗滌緩衝液以終止細胞裂解，且將樣品離心且再一次以培養基(RPMI、10% Hyclone FBS、1% 丙酮酸鈉、1% Glutamax、1% 非必需胺基酸、及 1% 青黴素-鏈黴素)洗滌。然後在 250-mL 燒瓶中在培養基中在 50 ng/mL 人類重組 M-CSF (Gibco, 目

錄號 PHC9501)存在下使人類單核球分化成巨噬細胞。在第 3 日摻入新鮮人類 M-CSF 且隨後在第 5 日收穫人類巨噬細胞並用於檢定。

2. AlphaLisa 檢定

【0245】 使用 Perkin Elmer pSyk AlphaLisa 套組之標準方案檢定細胞裂解物之 pSyk。簡言之，將 10 μ L 裂解物/孔轉移至百色不透明 384 孔 Optiplate (Perkin Elmer)。接著，每孔添加 5 μ L Acceptor Mix (含有受體珠粒之工作溶液)，隨後以鋁箔密封盤且在室溫下培育 1 小時。隨後，在減少光照條件下向各孔添加 5 μ L Donor Mix (含有供體珠粒之工作溶液)。再次密封盤且在室溫下培育 1 小時。最後，在 Perkin Elmer EnVision 盤讀取器上使用 AlphaLisa 設置讀取該等盤。

【0246】 圖 2 示出原代人類巨噬細胞中 pSyk 信號活化之代表性抗 TREM2 抗體劑量反應曲線。實心黑色圓圈(●)表示抗 TREM2 抗體，且空心白色圓圈(○)表示同型對照。各曲線表示獨立實驗之平均值，且 EC₅₀ 值提供於以下表 1 中。結果指示抗 TREM2 抗體能夠活化原代人類巨噬細胞中之 TREM2-DAP12 ITAM 信號傳導。

iPSC 小神經膠質細胞中之脂質體反應檢定

【0247】 TREM2 促效劑抗體及含有磷脂醯絲胺酸之脂質體經由 TREM2 活化 pSyk。為了理解在脂質體存在下抗 TREM2 抗體對 Syk 信號傳導之作用，將 iPSC 小神經膠質細胞用抗 TREM2 抗體預處理，隨後評定細胞中之脂質體反應。

【0248】 在檢定前，首先使用可商購獲得之套組(來自 StemCell Technologies 之 STEMdiff Hematopoietic 套組)使 iPSC 分化成造血先驅細胞(HPC)。將 HPC 轉移至含有原代人類星形細胞之盤中且共培養 14-21 日。一旦共培養中之浮動細胞主要鑑別為成熟小神經膠質細胞(>80%)，則將該小神經膠質細胞用於檢定。

【0249】 在檢定前兩日，將人類 iPSC 小神經膠質細胞以 30,000 個細胞/孔接種在塗覆聚-D-離胺酸之 96 孔盤上。將抗體以 100 nM 稀釋到含有 IMDM、10% Hyclone FBS、及 1%青黴素-鏈黴素之培養基中，且向該等細胞給予抗體溶液達 24 小時或在 37°C 下達 5 分鐘。隨後，將細胞用 HBSS 洗滌一次且然後在 37°C 下給予 1 mg/mL 含有 70% DOPC 及 30% POPS 之脂質囊泡達 5 分鐘。藉由輕擊該盤來去除脂質體溶液，且添加 30 μ L 含有 1 μ M PMSF 之裂解緩衝液(Cell Signaling Technologies, CST)。然後將裂解物冷凍在 -80°C 下或立即以 AlphaLisa 檢定進行檢定。如上文所述使用 Perkin Elmer pSyk AlphaLisa 套組之標準方案檢定細胞裂解物之 pSyk。

【0250】 圖 3A 及圖 3B 示出與抗 TREM2 抗體一起培育、隨後給予脂質囊泡且評定細胞中之脂質體反應之人類 iPSC 小神經膠質細胞中的 pSyk 信號活化。白條指示使用 PBS 代替脂質囊泡作為對照進行之培育。資料指示 2-7 個獨立實驗之平均值及標準誤差。圖 3A 示出用抗體預處理 5 分鐘之 iPSC 小神經膠質細胞的資料，且圖 3B 示出用抗體預處理 24 小時之 iPSC 小神經膠質細胞的資料。結果顯示用抗 TREM2 抗體預處理人類 iPSC 小神經膠質細胞使得經脂質體引發之磷酸 Syk 信號與同型對照相比增加，這表明抗 TREM2 抗體不會干擾、相反會增強細胞中之 pSyk 信號傳導的脂質活化。

人類 TREM2 NFAT 報告基因檢定

【0251】 如下生成人類 TREM2/DAP12 表現 Jurkat NFAT 細胞株。用表現人類 TREM2 及 DAP12 之慢病毒載體感染 Jurkat NFAT 報告基因細胞且在含有 10% Hyclone FBS 及 1%親黴素/鏈黴素之 RPMI 中培養。在嘌呤黴素及吉歐黴素存在下選擇穩定表現之純系。藉由流動式細胞測量儀使用生物素化抗 TREM2 抗體(SEQ ID NO:66 及 67)評估細胞表面 TREM2 表現。選擇顯示最高野生型 TREM2 表現

水準之純系且將其命名為 hTrem2/NFAT Jurkat 報告基因細胞以用於下文所述之檢定。

【0252】 在檢定前一日，將 96 孔盤用 0-500 nM 劑量滴度(45 μ L/孔，總計 12 點)之抗 TREM2 抗體或同型對照預塗覆，且在 4°C 下培育隔夜。在隔夜培育後，將預塗覆盤用 PBS 洗滌兩次且然後裝載 200 μ L 新鮮培養基(具有 10% Hyclone FBS 及 1% 親黴素/鏈黴素之 RPMI)中之 hTrem2/NFAT Jurkat 報告基因細胞(10^6 個細胞/孔)。將盤在 37°C 下培育 24 小時，之後向各孔中添加 50 μ L/孔 quantlucia 溶液，且良好混合。對於分析，自各孔中移出 20 μ L 溶液且將其轉移至 384 孔白色盤以用於藉由光度計(Perkin Elmer Envision)量測信號。

【0253】 圖 4 包括如藉由偵測報告基因螢光素酶所量測之用於活化 NFAT 的代表性抗 TREM2 抗體劑量反應曲線且活化之 EC_{50} 值提供於以下表 1 中。圖 4 中之結果顯示相對於同型對照，候選抗 TREM2 抗體能夠誘導 NFAT 活化及足夠下游信號傳導以活化轉錄反應。

人類巨噬細胞之存活檢定

【0254】 根據 RosetteSep 人類單核球募集混合方案(Stemcell Technologies)分離人類單核球。將經分離單核球以洗滌緩衝液(PBS+2% FBS)洗滌且重懸浮於 10 mL ACK 裂解溶液(ThermoFisher Scientific，目錄號 A10492)中以裂解紅血細胞。添加二十(20) mL 洗滌緩衝液以終止裂解。將細胞懸浮液離心並用培養基(RPMI 1640 + 10% FBS + 青黴素/鏈黴素)洗滌一次。將細胞以 10^6 個細胞 μ L/mL 之密度重懸浮於培養基中且用於下文所述之存活檢定中。

【0255】 在檢定前一日，將 96 孔盤用 0-200 nM 劑量滴度(45 μ L/孔，總計 12 點)之抗 TREM2 抗體或同型對照預塗覆，且在 4°C 下培育隔夜。在隔夜培育後，將預塗覆盤用 PBS 洗滌兩次且然後在低濃度人類 M-CSF (5 ng/mL, Gibco，目錄

號 PHC9501)存在下裝載人類單核球(10^5 個細胞/孔)。在 37°C下 5 日後，抽吸培養基，且向各孔中添加 100 μ L PBS + 100 μ L Celltiter-glo 培養基(Promega，目錄號 G7571)。在培育 10 分鐘後，將細胞培養基轉移至對於光度計用途相容之多孔盤，且記錄細胞活力之發光。

【0256】 圖 5 示出在低 M-CSF 條件下人類巨噬細胞中之細胞存活的代表性抗 TREM2 抗體劑量反應曲線，且存活之 EC_{50} 值提供於以下表 1 中。結果指示 TREM2 促效劑抗體具有誘導轉錄反應之足夠受體活化能力以用於在 M-CSF 條件下調節細胞功能且促進人類巨噬細胞之存活。

抗體之 Biacore 動力學量測

【0257】 使用表面電漿子共振(Biacore™ 8K instrument)來量測抗 TREM2 抗體對人類及獼猴 TREM2 ECD 之親和力。使用人類 Fab 捕獲套組(GE Healthcare Life Sciences，目錄號 28958325)在 Biacore 系列 S CM5 感測器晶片(GE Healthcare Life Sciences，目錄號 29149604)上捕獲抗 TREM2 抗體。以 30 μ L/min 流速注射重組人類或獼猴 TREM2 之系列 3 倍稀釋液。在 HBS-EP+運行緩衝液(GE Healthcare Life Sciences，目錄號 BR100669)中，監測抗體結合達 300 秒，隨後監測抗體解離達 600+秒。藉由自空白流量池減去 RU 值來校正結合反應。使用 k_{on} 及 k_{off} 之同時擬合之 1:1 Languir 模型進行動力學分析。 K_D 結合值提供於以下表 1 中。

表 1. 抗體之活體外特徵

抗體	Biacore hTREM2 K_D (nM)	Biacore cyno TREM2 K_D (nM)	pSyk 活化(人 類巨噬細胞) EC_{50} (nM)	pSyk 活化 (HEK293-H6) EC_{50} (nM)	細胞結合 (人類巨噬細 胞) EC_{50} (nM)	NEAT EC_{50} (nM)* *塗覆 mAb 之 盤	-存活 EC_{50} (nM)* *塗覆 mAb 之盤
CL0020123	0.068	5.7	7 ± 2.7		0.3	不可計算	44.7 ± 30.3
CL0020188	5.2	2.0	7.7 ± 1.5		0.5	91.2 ± 47.0	2.4 ± 1.3

NB: 未偵測到結合

ND: 未確定

實例 2. 人類巨噬細胞中可溶性 TREM2 水準及吞噬作用行為之調節

人類巨噬細胞中可溶性 TREM2 劑量反應檢定

【0258】 如上文所述生成人類巨噬細胞. 在檢定前一日, 將人類巨噬細胞以 100,000 個細胞/孔接種在塗覆聚-D-離胺酸之 96 孔盤上。將抗體以人類巨噬細胞培養基(RPMI、10% Hyclone FBS、1%丙酮酸鈉、1% Glutamax、1%非必需胺基酸、及 1%青黴素-鏈黴素)稀釋, 自 300 nM 開始且以 10 點連續稀釋滴定繼續, 各點之間有 3 倍稀釋。向細胞給予該等抗體且培育 24 小時。在與抗體一起培育之後, 將該盤離心以去除碎片, 且收集上清液以用於進行可溶性 TREM2 量測。

【0259】 如下量測可溶性 TREM2。簡言之, 在 4°C 下將 MSD 小斑點鏈黴素盤(Meso Scale Discovery)用生物素化抗 hTREM2 單株抗體(R&D Systems)塗覆隔夜。然後在室溫下將盤用 3% BSA/TBST 封閉 1 小時。藉由加熱至 95°C 達 5 分鐘來以含 SDS 緩衝液製備樣品及標準物。在封閉後在檢定盤中以 3% BSA/TBST 1:10 稀釋所製備樣品及標準物。將以 3% BSA/TBST 稀釋之 TREM2-His 蛋白作用於絕對量化之標準物。在室溫下培育兩小時後, 用 TBST 洗滌盤。將初級偵測抗體經碘基標記之山羊抗人類 TREM2 (R&D Systems)以 3% BSA/TBST 稀釋, 添加到盤中, 且在室溫下培育一小時。在用 TBST 洗滌後, 使用 2x MSD 讀取緩衝液 T 顯影 MSD 盤, 隨後使用 MSD Sector 盤讀取器進行偵測。藉由使用 Prism 7.0 軟體(Graphpad)擬合標準曲線來將 MSD 值轉換為 sTREM2 之絕對量。TREM2 脫落之調節表示為來自與測試抗 TREM2 抗體一起培育之細胞的可溶性 TREM2 正規化至來自未與特異性抗 TREM2 抗體一起在培養基中培養之細胞的可溶性 TREM2 的比率。

【0260】 圖 6 示出隨著抗 TREM2 抗體濃度變化之代表性可溶性 TREM2 水準 (sTREM2)。結果指示抗 TREM2 抗體能夠在處理隔夜後以劑量依賴性方式降低人類巨噬細胞中之 sTREM2 水準。

人類巨噬細胞中之吞噬作用檢定

【0261】 如上文所述生成人類巨噬細胞。在檢定前兩日，將人類巨噬細胞以 80,000 個細胞/孔接種在塗覆聚-D-離胺酸之 96 孔盤上。將抗體以 100 nM 稀釋到含有 RPMI、10% Hyclone FBS、1% 丙酮酸鈉、1% Glutamax、1% 非必需胺基酸、及 1% 青黴素-鏈黴素之培養基中。然後在 37°C 下向細胞給予抗體溶液達 24 小時。然後將細胞核及細胞膜染色 10 分鐘，此後添加 5 µg/mL 之 pHrodo-髓磷脂。然後將細胞在 37°C 下培育 4 小時。在高容量共聚焦顯微鏡(Opera Phoenix)上量測每個細胞之 pHrodo 螢光，且在儀器軟體上量化螢光強度。

【0262】 藉由使用 Safaiyan 等人(2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998)所述之方法自野生型 C57Bl/6 小鼠大腦(Jackson Laboratories)中純化髓磷脂來製備 pHrodo-髓磷脂。在純化後，將髓磷脂重懸浮於 PBS 中且使用 DC Protein Assay 套組 2 (BioRad，目錄號 5000112)調整至 1 mg/mL 蛋白濃度。使用微量標記套組 (ThermoFisher，目錄號 P35363)根據製造商說明書用 pHrodo-紅標記髓磷脂。藉由在 10,000 g 下達 5 min 使髓磷脂沉澱、去除上清液、及重複該等步驟 3-5 次來去除過量標記物。

【0263】 圖 7 示出人類巨噬細胞中之吞噬作用檢定之代表性結果。藉由在經 TREM2 處理巨噬細胞之顯微影像中偵測且量化 pHrodo 螢光且將該等量測值與同型對照之量測值相比較來量測髓磷脂吞噬作用。結果顯示用示範性 TREM2 促效劑抗體處理之人類巨噬細胞相對於同型對照增加了 pHrodo-髓磷脂吞噬作用，這表明抗 TREM2 抗體可能夠有益地清除細胞中之髓磷脂碎片。

實例 3. 血漿之處理 iPSC 小神經膠質細胞中脂質積聚之調節

脂質保存檢定

【0264】 在檢定之前，首先使用可商購獲得之套組(來自 StemCell Technologies 之 STEMdiff Hematopoietic 套組)使 iPSC 分化成造血先驅細胞(HPC)。將 HPC 轉移至含有原代人類星形細胞之盤中且共培養 14-21 日。一旦共培養中之浮動細胞主要鑑別為成熟小神經膠質細胞(>80%)，則將該小神經膠質細胞用於檢定。

【0265】 將細胞(iPSC 小神經膠質細胞，30,000 個細胞/孔)接種到經 PDL 塗覆之 96 孔盤之完全血清培養基中。在 37°C 下 24 小時後，經純化未標記髓磷脂(50 µg/mL 最終濃度，使用 Safaiyan 等人(2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998)中所述之方法自野生型 C57Bl/6 小鼠大腦(Jackson Laboratories)純化)摻入到各孔中。在 37°C 下脂質處理 24 小時後，將抗 TREM2 抗體或 RSV 對照摻入到孔中直至最終濃度為 100 nM。將細胞在 37°C 下再培育 48-72 小時，之後收集細胞或對細胞攝影。對於髓磷脂廓清實驗，在 24 小時培育時段之後去除髓磷脂，且以含抗體培養基置換以用於後續 24-48 小時培育。

【0266】 對於尼羅紅攝影，去除上清液，且在含有 1 µM 尼羅紅(ThermoFisher，目錄號 N1142)及 1 滴/mL Nucblue (ThermoFisher，目錄號 R37605)之活細胞攝影緩衝液(Life Technologies，目錄號 A14291DJ)將細胞在 37°C 下培育 30 分鐘。在培育時段之後，去除染色溶液，且將細胞固定於 4%多聚甲醛中。然後在 Opera Phoenix 高容量共聚焦攝影機上使用 Alexa 568 及 DAPI 照射設置來對細胞攝影。在提供儀器之 Harmony 軟體上使用斑點發現算法分析液體斑點。圖 8A 包括以媒劑或髓磷脂(50 µg/mL 最終濃度)處理 24 小時、隨後與同型對照或示範性抗 TREM2 抗體(CL0020123)一起培育 72 小時之 iPSC 小神經膠質細胞的代

表性顯微術影像。圖 8B 為用於圖 8A 之顯微術影像中之相同抗 TREM2 抗體的代表性長條圖。藉由每個細胞之總斑點強度來對尼羅紅染色進行量化，且資料展示為相同顯微術樣品之不同領域內的三個技術性重複物的平均值及標準偏差。

【0267】 對於脂質組學分析，在保持於冰上時將細胞用 PBS 洗滌一次。將含有 1:100 內部標準物之 70 μ L 體積的 9:1 甲醇:水溶液添加到 96 孔盤之細胞中。在振盪器上在 4°C 及 1200 rpm 下將盤攪拌 20 分鐘且然後在 300 x g 下離心 5 分鐘。將 50 μ L 上清液樣品轉移至 LCMS 小瓶且保持在 -80°C 下，直至在儀器上分析。

【0268】 藉由與電噴霧質譜儀(QTRAP 6500+, Sciex, Framingham, MA, USA) 耦合之液相層析儀(Shimadzu Nexera X2 系統，Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA)來分析液體水準。對於各分析，在 55°C 下使用 0.25 mL/min 流速將 5 μ L 樣品注入 BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm 管柱(Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)。對於正電離模式，流動相 A 由 60:40 乙腈/水(v/v) 及 10 mM 甲酸銨+ 0.1%甲酸組成；流動相 B 由 90:10 異丙醇/乙腈(v/v)及 10 mM 甲酸銨+ 0.1%甲酸組成。對於負電離模式，流動相 A 由 60:40 乙腈/水(v/v)及 10 mM 甲酸銨組成；流動相 B 由 90:10 異丙醇/乙腈(v/v)及 10 mM 甲酸銨組成。梯度如下程式化：0.0–8.0 min 自 45% B 至 99% B、在 99% B 下 8.0–9.0 min、9.0–9.1 min 內至 45% B、及在 45% B 下 9.1–10.0 min。採樣以下設置以正或負離子模式進行電噴霧電離：在 30 下之簾氣；以中值設置之碰撞氣體；在 5500 (正模式) 或 4500 (負模式)下之離子噴霧電壓；在 250°C(正模式)或 600°C (負模式)下之溫度；在 50 下之離子源氣體 1；在 60 下之離子源氣體 2。使用 Analyst 1.6.3 (Sciex) 以多重反應監測模式(MRM)進行資料採集，其採用以下參數：留置時間(ms)及

碰撞能量(CE)；在 80 下之去叢集電位(DP)；在 10 (正模式)或-10 (負模式)下之入口電位(EP)；及在 12.5 (正模式)或-12.5 (負模式)之碰撞室出口電位(CXP)。使用費內源性內部標準物之混合物量化液體。基於其反應時間及可商購獲得之參考標準物(Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, USA)之 MRM 特性鑑別液體。

【0269】 圖 8C 及圖 8D 示出在 24 小時髓磷脂處理後以示範性抗 TREM2 抗體處理 72 小時之 iPSC 小神經膠質細胞的細胞裂解物中如藉由質譜法偵測之膽固醇酯(CE) (圖 8C)及三酸甘油酯(TAG)脂質種類(圖 8D)的水準。圖 8E 及圖 8F 示出經歷使用示範性抗 TREM2 抗體之髓磷脂廓清實驗之 iPSC 小神經膠質細胞的細胞裂解物中如藉由質譜法偵測之膽固醇酯(CE) (圖 8E)及三酸甘油酯(TAG)脂質種類(圖 8F)的水準。將圖 8C-8F 中生成之 LC/MS 資料正規化至 CE 資料之內部標準物且正規化至 TAG 資料之各個別脂質種類之髓磷脂+同型對照。

【0270】 iPSC 小神經膠質細胞中之脂質積聚藉由髓磷脂處理誘導，這由中性脂質染色(尼羅紅)增加所反映且藉由用於偵測細胞裂解物中之特定脂質種類的 LC/MS 反映。圖 8A-8F 中示出之資料總體指示在髓磷脂攻擊後用示範性抗 TREM2 抗體處理 iPSC 小神經膠質細胞減少了脂質種類之積聚，如由細胞中之中性脂質染色之減少所指示且由藉由 LC/MS 量測之 CE 及 TAG 脂質種類減少所指示。在 24 小時至 72 小時範圍之不同時間點觀測到由抗體處理引起之脂質水準減小。為了消除藉由阻斷脂質攝取引起脂質水準減小之可能性，進行髓磷脂廓清實驗，其中髓磷脂在添加抗 TREM2 抗體前去除。圖 8F 繪示在抗體處理前具有髓磷脂廓清之 iPSC 小神經膠質細胞中相對於同型對照，抗 TREM2 抗體亦減少脂質水準。

實例 4. 抗體之功能抗原決定基分區

【0271】藉由在 TREM2 蛋白上之競爭性結合來確定 TREM2 抗體抗原決定基小區(bin)。在 Catterra LSA 儀器上在 25°C下使用經典夾心抗原決定基分區組態方法進行抗原決定基分區實驗。藉由胺偶合將所有測試抗體固定到 HC30M 晶片上。然後對測試抗體進行多個循環的夾心競爭結合。各循環由抗原(經 His 標記 TREM2 ECD)注射到固定抗體、隨後分析物抗體注射到固定抗體組成。在各循環結束時，藉由注射含有 1.25 M NaCl 之低 pH 緩衝液(pH = 3)再生固定抗體之表面。藉由 Catterra 軟體評估抗原決定基結合資料以創建競爭矩陣及抗原決定基分區。結果提供於表 2 中。

【0272】藉由對抗 TREM2 抗體進行抗原決定基分區來鑑別兩個促效劑小區：(1)柄結合促效劑及(2) IgV 域結合促效劑。具有相同小區之抗體證實相同功能，例如藉由脂質配體(拮抗劑抗體)抑制 TREM2-DAP12 pSyk 活化、單獨抗體(柄結合促效劑、IgV 域結合促效劑)活化 pSyk。

表 2. 由功能類別標注之抗 TREM2 抗體小區

小區 1	小區 2
柄促效劑	IgV 促效劑
CL0020188	CL0020123

實例 5. 抗體與 TREM2 柄肽之結合

【0273】評估 TREM2 抗體與人類及小鼠 TREM2 柄區肽之結合。測試肽包括：(1)全長柄區(人類 TREM2 之胺基酸 129-172，UniProtKB Q9NZC2；小鼠 TREM2 之胺基酸 131-169，UniProtKB Q99NH8)及(2)含有 ADAM10/17 裂解位點之截短柄肽(人類/小鼠 TREM2 之胺基酸 149-163)。使用標準夾心 ELISA 偵測抗體與 TREM2 柄肽之結合。簡言之，在 4°C下將 96 孔半區域 ELISA 盤用鏈黴素塗覆隔夜。次日，將以 1% BSA/PBS 稀釋之生物素化 TREM2 柄肽添加到該盤中且培育 1 小時。然後添加以 1% BSA/PBS 稀釋之抗體且培育 1 小時。使用以 1%

BSA/PBS 稀釋之抗人類 κ -HRP 次級抗體(Bethyl Laboratories, Inc.)偵測與肽結合之抗體。藉由與偵測試劑(One-step TMB Ultra, Thermo)反應且由標準分光光度測定法儀器(BioTek®)量測在 450 nm 下之吸光度(A450)來檢定盤。結果提供於下表 3 中。資料展示為正規化值(相對於背景之倍數，其中背景=同型對照)。

表 3. 抗 TREM2 抗體與 TREM2 柄肽之結合

	對照	881020018	CL0020123
人類 TREM2 肽結合 (aa 149-163)	1.0	3.0	1.2
人類 TREM2 肽結合 (aa 129-172)	1.0	51	1.2
小鼠 TREM2 肽結合 (aa 149-163)	1.0	0.9	0.9
小鼠 TREM2 肽結合 (aa 131-169)	1.0	33	1.0

【0274】 表 3 示出支持表 2 中之抗原決定基分區資料之人類及小鼠柄區肽-抗體結合相互作用。基於表 3 中之資料，某些抗 TREM2 抗體似乎結合之位點對應於 TREM2 細胞外柄區之胺基酸 129-148。

【0275】 亦使用螢光極化檢定分析抗 TREM2 抗體抑制 ADAM17 對 TREM2 柄肽之裂解的能力。首先以具有鏈黴素之檢定緩衝液(25 mM Tris pH 7.5、2.5 μ M ZnCl₂、0.005% Brij-35)製備 TREM2 柄肽。然後在室溫下將抗 TREM2 抗體與 TREM2 柄肽預培育 30 分鐘。在預培育時段之後，添加 ADAM17 (R&D systems，目錄號 930-ADB)且在 37°C 下與肽一起培育 20 小時。次日，以檢定緩衝液進一步稀釋樣品且將其轉移至黑色不透光 384 孔盤。隨後在 Perkin Elmer EnVision 盤讀取器上量測螢光極化。將與抗 TREM2 抗體預培育之 TREM2 柄肽之螢光極化與全長 TREM2 柄肽及酶對照(具有 ADAM17 之全長 TREM2 柄肽)之螢光極化相比較。

【0276】 TREM2 柄結合抗體顯著增強螢光極化，這表明部分抑制由 ADAM17 (純系 CL0020141、CL0020188、CL0020313、CL0020308)所進行之柄肽裂解。IgV 結合抗體 CL0020107 並未結合 TREM2 柄區肽且因此在螢光極化檢定中未展示對肽裂解之作用。

實例 6. 抗 TREM2 抗體之藥物動力學分析

【0277】 在小鼠中評估抗 TREM2 抗體之藥物動力學特徵。C57BL/6J 小鼠購自 Jackson Laboratory (儲備號 000664)，2 月齡大，用於 7 日藥物動力學(PK)研究及靶標接合研究。使用 3 月齡大之人類 Trem2 cDNA KI 同型接合小鼠 (*huTrem2^{KI/KI}*)進行 24 小時靶標接合研究。下文描述了人類 Trem2 cDNA KI 小鼠之傳代及繁殖。

人類 Trem2 cDNA KI 小鼠模型之生成

【0278】 如下生成人類 TREM2 cDNA KI 小鼠(*huTrem2^{KI/KI}*)。將人類 Trem2 cDNA-pA 序列插入在小鼠 Trem2 內源性 ATG 起始位點。插入人類 Trem2 cDNA-pA 導致小鼠 Trem2 之外顯子 1 序列被置換，這允許表現由內源性小鼠啟動子驅動之人類 Trem2 cDNA 且破壞內源性小鼠 Trem2 之表現。在 C57BL/6 遺傳背景下使用同源重組生成 *huTrem2^{KI/KI}* 小鼠。

【0279】 對於 *huTrem2^{KI/KI}* 靶向載體，長同源臂(LA)在人類 Trem2 cDNA-pA 序列之 5'端上游延長約 3.6 kb，且短同源臂(SA)在 FRT 側接 Neo 盒之 3'下游延長約 2.3 kb。長同源臂及短同源臂二者均自 C57BL/6 BAC 純系(RP23: 358G22)擴增且然後亞選殖到含有胺苄青黴素選擇盒之約 2.4kb pSP72 (Promega)主鏈載體中。將 hUBS-gb2 FRT 側接之新黴素盒恰好插入在 hTrem2-pA 盒下游，從而產生大小約 13.6 kb 之靶向載體。將十(10) μ g 靶向載體用限制性酶 Not I (New England Biolabs)線性化且隨後藉由電穿孔轉染到 FLP C57Bl/6 (B6)胚胎幹細胞(ES)。在以

G418 抗生素進行選擇後，擴增存活純系以用於 PCR 分析以鑑別陽性重組 ES 純系。用於 PCR 篩選之引子序列(SEQ ID NO:53 = 5'-AGG AAT GTG GGG AGC ACG GAG-3' 且 SEQ ID NO:54 = 5'- TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG GTG-3') 擴增在 3' 區外部短同源臂(SA)下游含有來自 bghpA 元件之區域的 2.81-kb 片段。將五個純系鑑別為陽性且選擇用於進一步擴增。在 ES 純系擴增期間藉由 Flp 轉殖基因去除 Neo 盒。

【0280】 首先藉由測序分析表徵自五個陽性純系提取之基因組 DNA。擴增 1.19-kb 產物且藉由引子(SEQ ID NO:55 = 5'- ACC CTA GTC CTG ACT GTT GCT C-3' ; SEQ ID NO:56 = 5'- TAT AGG AAC TTC GCG ACA CGG ACA C-3') 進行測序以證實 5' 基因組/neo 盒接頭區及 3' KI 盒接頭區。測序結果證實將人類 Trem2 cDNA-pA 序列引入在所有五個純系中。

【0281】 藉由南方墨點分析使用靶向短臂及長臂之探針來進一步表徵五個陽性純系。將以 Ssp I 及 Bam HI 消化之 ES 細胞基因組 DNA 分別與短臂及長臂探針雜交。證實所有五個 ES 純系在長臂及短臂二者中攜帶校正的同源重組事件。用於擴增短臂探針(658 bp)之引子序列為(SEQ ID NO:57 = 5'- ACA GGA GGG ACC TAC CTT CAG 3' ; SEQ ID NO:58 = 5'- GCC TGC CTT TCA GAG ACC TCA GTC -3)。用於擴增長臂探針(681 bp)之引子序列為(SEQ ID NO:59 = 5'- CCT CTC CGG CTG CTC ATC TTA CTC -3' ; SEQ ID NO:60 = 5'- GTC TCT CAG CCC TGG CAG AGT TTG -3')。

【0282】 然後將所有五個 ES 細胞純系注入 C57BL/6 胚胎中。藉由 PCR 基因分型經由生殖系傳播來證實來自一個純系之幼崽。用於基因分型之引子為(SEQ ID NO:61 = pr1: 5'- CGC CTA CCC TAG TCC TGA CTG TTG -3'、SEQ ID NO:62 = pr2: 5'- AAA GCC TAC AGC ATC CTC ACC TC -3' ; 及 SEQ ID NO:63 = pr3: 5'-

GCA TCA TGG GGT TGT AGA TTC CG -3')。野生型上 pr1/pr2 之 PCR 產物為 658 bp。KI 對偶基因上 pr1/pr3 之 PCR 產物為 469 bp。

抗體給藥及血漿/CSF 收集

【0283】 對於 PK 分析，透過靜脈內(IV)尾靜脈注射向 C57BL/6J 小鼠給予 10 mg/kg 抗 TREM2 抗體或對照 IgG (給藥體積為約 200 μ L/小鼠，各組 n = 3)。在給藥後 1 小時、24 小時、4 日、及 7 日收集血液樣品。藉由使用 3-mm 刺血計 (GoldenRod 動物刺血計)透過頷下出血收集前三個時間點之血液樣品。在第 7 日透過心臟穿刺收集最後一個血液樣品。將血液收集在 EDTA 管(Sarstedt Microvette 500 K3E，目錄號 201341102)中，將其緩慢倒置以混合，且在 4°C 下離心。將血漿(頂部)層轉移至 1.5-mL Eppendorf 管且保存在 -80°C 下，直至分析。

【0284】 對於 24 小時靶標接合研究，使用 C57BL/6J 小鼠測試小鼠替代品抗 TREM2 抗體，且使用 huTrem2^{KI/KI} 小鼠測試人類抗 TREM2 抗體。透過靜脈內(IV)尾靜脈注射向小鼠給予 100 mg/kg 抗 TREM2 抗體或對照 IgG (給藥體積為約 200 μ L/小鼠，各組 n = 5)。給藥前 24 小時收集血液樣品以確定 TREM2 基線水準。給藥後 24 小時收集最終血液及 CSF 樣品。如上文所述製備血漿製劑。為了收集 CSF 樣品，在顱骨背面做出矢狀解剖，且分離皮下組織及肌肉以暴露大池。使用預拉伸玻璃毛細管來穿刺大池且收集 CSF 樣品。然後在 4°C 下離心 CSF 以去除血液殘餘物，且將 CSF 上清液轉移至 0.5-mL Low Protein LoBind Eppendorf 管 (Eppendorf，目錄號 022431064)，以用於保存在 -80°C 下，直至分析。

活體內抗 TREM2 抗體血漿水準之分析

【0285】 對於抗 TREM2 抗體 PK 分析，使用一般人類抗 Fc 夾心 ELISA 量化小鼠血漿中之總抗體濃度。將 384 孔 MaxiSorp 盤用 1 μ g/mL 抗 huFc 駱多株抗體 (Jackson ImmunoResearch)塗覆隔夜。在與檢定緩衝液(PBST、1% BSA)中 1:2,000

或 1:20,000 稀釋之血漿一起培育之後，添加結合至 HRP 之抗 huFc 駢抗體(Jackson ImmunoResearch)作為偵測試劑。使用 3 倍稀釋使用五參數邏輯迴歸生成 2 nM 至 2.7 pM 之各個別抗體之標準曲線。

【0286】 圖 9 示出某些抗 TREM2 抗體之代表性小鼠 PK 特徵。提供在 7 日時段內各代表抗體之抗體清除率(CL [mL/day/kg])且將其與正常無效應子同型對照相比較。圖 9 中示出之各抗體表現出相對於同型對照相當的清除率。

活體內靶標接合：*sTREM2* 血漿水準

【0287】 為了量測可溶性 TREM2 (sTREM2)血漿水準，使人類 TREM2 cDNA KI 小鼠(huTrem2^{KI/KI})出血且然後用 100 mg/kg 測試抗 TREM2 抗體或同型對照靜脈內處理。給藥後 24 小時使小鼠出血。自血液樣品獲得血漿且在如下進行之 MSD 檢定中評估。將 MSD SECTOR 盤用以 PBS 稀釋之 1 µg/mL 捕獲抗體(R+D 抗 TREM2 抗體，目錄號 MAB17291-100)塗覆且在 4°C 下培育隔夜。將樣品孔用未經稀釋 MSD 封閉劑 A 封閉 1 小時。將血漿以含有 0.05% Tween-20 之 Tris 緩衝鹽水(TBST)中之 25% MSD 封閉劑 A 1:20 稀釋且將其添加到該盤上之各樣品孔中，然後將其在室溫下培育 2 小時。隨後將偵測抗體(MSD 磺基標記之山羊抗人類抗體，目錄號 R32AJ-1，1:1000)添加到各樣品孔，且將盤在室溫下培育 1 小時。使用 Biotek 盤洗滌器對各樣品孔進行 TBST 洗滌。添加偵測試劑(MSD 讀取緩衝液)且使用 MSD Meso Sector S600 讀取器量測以獲得 sTREM2 與抗體結合之結果。

【0288】 圖 10A 及圖 10B 示出在 huTrem2^{KI/KI} 血漿中示範性抗 TREM2 抗體之總 sTREM2 水準(圖 10A)及經抗體結合 sTREM2 水準(圖 10B)。為了總 sTREM2 及經結合 sTREM2 檢定，將資料正規化至給藥前 sTREM2 基線水準。結果指示總循環 sTREM2 水準不會顯著影響以抗 TREM2 抗體處理之小鼠與以該抗體處理

24 小時後之同型對照相比之變化，這表明總循環 sTREM2 水準在抗體給藥後的早期時間點未受影響。相比之下，經抗體結合 sTREM2 水準在以抗 TREM2 抗體注射之小鼠中相對於同型對照更高。

實例 7. 抗 TREM2 抗體之序列最佳化及人源化

【0289】 對示範性抗 TREM2 抗體進行序列最佳化及人源化，隨後對結合動力學及結合特異性進行表徵。

【0290】 藉由在 CDR 序列內搜索易於化學修飾之殘基(例如，天冬醯胺脫醯胺化基序(NG)、天冬胺酸異構化基序(DS)、及潛在氧化殘基(色胺酸(W)及甲硫胺酸(M))且以保守性且生殖系殘基進行胺基酸取代以去除此類序列文庫來進行序列最佳化。然後使用 Biacore 及與 HEK293-H6 細胞之劑量滴定細胞結合分析抗 TREM2 抗體之人源化且序列最佳化之變異體的結合動力學(關於代表性方案參見實例 1)。

【0291】 分析抗體 CL0020188 之人源化且序列最佳化之變異體之結合特徵的結果提供於表 4 中。修飾 CL0020188 CDR-H2 序列(SEQ ID NO:5)及 CDR-L1 序列(SEQ ID NO:7)中之 NG 基序，將其移植到人類構架區，且分析。表 4 提供 HEK293-H6 細胞中之如藉由 Biacore 量測之 K_D 值及如藉由劑量滴定結合檢定所量測之 EC_{50} 值。

表 4. CL0020188 之序列最佳化且人源化之變異體的結合特徵

純系	hV _H	hV _L	K _D	EC ₅₀
CL0020188-1	NG/移植物	NG/移植物	2.3 nM	0.42 nM
CL0020188-2	NG/3m	NG/移植物	3.4 nM	0.26 nM
CL0020188-3	NG/移植物	TG/移植物	6.8 nM	0.64 nM
CL0020188-4	NG/3m	TG/移植物	4.8 nM	0.44 nM
CL0020188-5	NA/移植物	NG/移植物	5.1 nM	0.45 nM
CL0020188-6	NA/3m	NG/移植物	4.0 nM	0.31 nM
CL0020188-7	NA/移植物	TG/移植物	10 nM	0.68 nM
CL0020188-8	NA/3m	TG/移植物	7.3 nM	0.51 nM
親本			9.5 nM	0.44 nM

3m = V_H 中之 A24G/L45P/V48L

【0292】 如表 4 所示，CL00201088 之人源化且序列最佳化之純系對 hTREM2 表現出之親和力值類似於親本抗體(K_D = 9.5 nM)，如藉由 Biacore 所量測。這與表 4 中所示之 HEK293-H6 細胞中的細胞結合結果一致。與親本抗體(EC₅₀ = 0.44 nM)相比，人源化且序列最佳化之純系對 HEK293-H6 細胞中所表現之 TREM2 表現出相當且亞奈莫爾之親和力。總之，結果指示親本抗體與人源化且序列最佳化變異體之間的相當結合動力學。

【0293】 分析抗體 CL0020123 之人源化且序列最佳化之變異體之結合特徵的結果提供於表 5 中。修飾 CL0020123 CDR-H2 序列(SEQ ID NO:30)中之 NG 及 DS 基序，將其移植到人類構架區，且分析。表 5 提供 HEK293-H6 細胞中之如藉由 Biacore 量測之 K_D 值及如藉由劑量滴定結合檢定所量測之 EC₅₀ 值。

表 5. CL0020123 之序列最佳化且人源化之變異體的結合特徵

純系	hV _H	hV _L	K _D	EC ₅₀
CL0020123-1	NGDS/2m	Vκ 移植物	0.14 nM	0.25 nM
CL0020123-2	NGDS/1m	Vκ 移植物	0.18 nM	0.23 nM
CL0020123-3	QGDS/2m	Vκ 移植物	0.40 nM	0.24 nM
CL0020123-4	NGES/2m	Vκ 移植物	0.17 nM	0.17 nM
CL0020123-5	QGES/2m	Vκ 移植物	0.44 nM	0.37 nM
CL0020123-6	QGDS/1m	Vκ 移植物	0.32 nM	0.29 nM
CL0020123-7	NGES/1m	Vκ 移植物	0.15 nM	0.19 nM
CL0020123-8	QGES/1m	Vκ 移植物	0.39 nM	0.38 nM
親本			0.10 nM	0.26 nM

1m = V_H 中之 R71A

2m = V_H 中之 V67A/R71A

【0294】 與親本抗體(K_D = 0.10 nM)相比，人源化且序列最佳化之純系表現出高約 4 倍之與 hTREM2 結合之 K_D 值，如藉由 Biacore 所量測。另一方面，在 HEK293-H6 細胞之劑量滴定細胞結合檢定中，人源化且序列最佳化之純系對 TREM2 表現出相當且亞奈莫爾親和力。

實例 8. 序列最佳化、人源化抗 TREM2 抗體之活體外表徵

【0295】 藉由如實例 1 及 3 中所述之活體外方法評估示範性序列最佳化且人源化之抗 TREM2 抗體(實例 7)。評定抗體在表現 TREM2 之 HEK 細胞中之 TREM2 結合、HEK-H6 細胞中之 TREM2 依賴性 pSyk 信號傳導、促進人類巨噬細胞存活之能力、及調節 iPSC 小神經膠質細胞中之脂質積聚的能力。圖 11 至 14 示出代表性抗 TREM2 抗體之結果。抗 TREM2 抗體在使用表現 TREM2 之 HEK293-H6 細胞的檢定中表現出良好細胞結合(EC50 值為 0.34 nM (圖 11A)及 0.08 nM (圖 11B)。抗 TREM2 抗體亦活化表現 TREM2 之 HEK293-H6 細胞中之 pSyk 磷酸化(圖 12A 及 12B)。另外，抗 TREM2 抗體誘導巨噬細胞存活，其中對於 CL0020188 變異體抗體觀測到更好存活活性(圖 13)。最後，抗 TREM2 抗體證實了減少經髓磷脂處理之 iPSC 小神經膠質細胞中之脂質積聚的能力(圖 14A 及 14B)。

實例 9. 序列最佳化、人源化抗 TREM2 抗體之小鼠 PK

【0296】 在類似於實例 6 中所述之 7 日藥物動力學(PK)研究的野生型小鼠中評估某些序列最佳化、人源化抗 TREM2 抗體(實例 7)之藥物動力學特徵。各劑量組含有 n=3 只小鼠。表 6 提供示範性序列最佳化且人源化抗 TREM2 抗體之 PK 特性(實例 7)。

表 6. 抗 TREM2 抗體之小鼠 PK 特性

純系	劑量(mg/kg)	C ₀ (μM)	AUC _{0-inf} (μM*h)	CL (mL/d/kg)
CL0020188 變異體	10	1.14 ± 0.05	207.78 ± 43.30	8.14 ± 1.80
CL0020188 變異體	50	6.48 ± 0.61	236.49 ± 2.67	34.58 ± 0.39
CL0020123 變異體	10	1.4999	223.1	13.2
抗 BACE 參考物	10	1.017	60.19	33.3

實例 10. 序列最佳化、人源化抗 TREM2 抗體之獼猴 PK

【0297】 在天然食蟹獼猴中評估抗 TREM2 抗體之藥物動力學特徵。經由靜脈內團式注射向 2-4 歲大(重約 2-3 kg)之天然食蟹獼猴注射抗 TREM2 抗體。投與劑量包括 3 mg/kg 及 25 mg/kg，其中每劑量組 n=3 只猴。在給藥前及在給藥後 10 分鐘、30 分鐘、1、6、12、及 24 小時、及 3、7、10、14、17、21、24、及 28 日收集血液樣品(約 1 mL)。將樣品冷凍在約 5°C 下，之後離心以獲得血漿，且將所獲得血漿保持在乾冰上，之後保存在-70°C 下，直至分析。如下分析血漿樣品之抗 TREM2 抗體水準。

【0298】 對於抗 TREM2 抗體 PK 分析，使用一般抗人類_IgG 夾心電化學發光免疫檢定(ECLIA)在 Meso Scale Discovery (MSD)平台上量化猴血漿中之總抗體濃度。簡言之，將 1%基於酪蛋白之 PBS 封閉緩衝液(Thermo Scientific, MA)添加到 MSD GOLD 96 孔小斑點經鏈黴素塗覆微量滴定盤(Meso Scale Discovery, MD)且培育約 1 h。在盤封閉及洗滌步驟後，將工作溶液中之 0.5 µg/mL 的生物素化抗人類_IgG 山羊抗體(SouthernBiotech, AL)添加到檢定盤中且使其培育 1-2 h。在培育及洗滌步驟後，將血漿測試樣品(亦即，具有抗 TREM2 人源化抗體之樣品)添加到檢定盤中且將其培育 1-2 h。注意測試樣品必須以檢定最小需要稀釋(MRD) 1:100、以 0.5%基於酪蛋白之 PBS 檢定緩衝液(Thermo Scientific, MA)稀釋，從而得到最終 1%血漿基質，之後添加到檢定盤中。在捕獲抗 TREM2 抗體分析物及洗滌步驟之後，將工作溶液中之 0.4 µg/mL 的次級釷化(SULFO-TAG)抗人類 IgG 山羊抗體(Meso Scale Discovery, MD)添加到檢定盤中且將其培育約 1 h。最後，在培育及洗滌步驟後，將檢定讀取緩衝液(1X MSD Read Buffer T)添加到檢定盤中以生成檢定樣品信號。來自 MSD 盤讀取器之樣品信號讀數係呈電化學發光(ECL)信號形式且以 ECL 單位(ECLU)表示。先前所述之所有檢定反應步驟均在周圍溫度下且在盤振盪器上振盪之情況下(在適當時)進行。該檢定具有

19.5 – 2500 ng/mL (或在 1:100 後 MRD 下為 0.195 – 25 ng/mL)之動態校準標準範圍，其 8 個標準點以 1:2 連續稀釋，再加上空白血漿樣品。根據使用加權四參數非線性邏輯迴歸擬合之檢定校準標準曲線反向計算血漿樣品濃度。表 7 提供示範性序列最佳化且人源化抗 TREM2 抗體之藥物動力學(PK)特性(實例 7)。

表 7. 抗 TREM2 抗體之獼猴 PK 特性

純系	劑量(mg/kg)	AUC _{0-inf} (μM*h)	CL (mL/d/kg)
CL0020188 變異體	25	899.0 ± 53	4.46 ± 0.26
CL0020188 變異體	3	61.2 ± 6.3	7.90 ± 0.77

【0299】 CL0020188 表現出在不同劑量水準之間的類似低清除率水準及食蟹獼猴之線性藥物動力學特徵。另外，不存在與在食蟹獼猴中投與變異體相關之臨床病理學發現(資料未示出)。

實例 11. 抗 TREM2 抗體之比較

【0300】 藉由 Biacore (實例 1 中所述)量測抗 TREM2 抗體對人類 TREM2 及獼猴 TREM2 之親和力。藉由 MSD 檢定量測抗 TREM2 抗體在健康人類志願者 CSF 樣品(Innovative Research)及健康食蟹獼猴 CSF 樣品(Worldwide Primates)中之功效。藉由其 EC50 確定各抗體之功效。簡言之，在室溫下將以捕獲抗體(生物素化山羊抗人類 TREM2，R&D Systems，目錄號 BAF1828)塗覆之 MSD GOLD 96 孔小斑點鏈黴素盤(MSD，目錄號 L45SA)與以檢定緩衝液(25% (v/v) MSD 封閉劑 A (MSD，目錄號 R93BA-A)、75% (v/v) TBST) 1:3 稀釋之生物流體樣品一起培育一個小時。在以 TBST 沖洗該等孔後，將經碘基標記之抗 TREM2 抗體以連續稀釋液(在 11 個點間 4x 稀釋)添加到該盤之孔中且將其在室溫下培育一小時。將該等孔用 TBST 稀釋，且將 MSD 讀取緩衝液(MSD，目錄號 R92TC-3)添加到孔中。使用 MSD Meso Sector S600 裝置量測來自樣品之信號。藉由四參數可變斜率非線性迴歸確定各抗體之 EC50 值。參考抗體#1 及#2 對應於 WO 2018/195506 中所述之 4C5 及 6E7。參考抗體#3 對應於 WO 2019/028292 中所述

之 AL2p-58。參考抗體#1 之可變區由 SEQ ID NO:73 及 74 表示。參考抗體#2 之可變區由 SEQ ID NO:75 及 76 表示。參考抗體#3 之可變區由 SEQ ID NO:77 及 78 表示。結果提供於表 8 中。

【0301】 如表 8 所示，如本文所揭示之 CL0020188 及 CL0020123 變異體相對於參考抗體對人類 TREM2 具有更強親和力且更有效於結合自健康人類志願者受試者分離之 CSF 樣品中的 sTREM2。CL0020188 變異體相對於參考抗體對獼猴 TREM2 具有更強親和力且更有效於結合自健康食蟹獼猴受試者分離之 CSF 樣品中的 sTREM2。這藉由達成在相同條件下結合給定量之 sTREM2 的半最大有效濃度(EC50)所需之抗體的相對量來證明。如表 8 所示，與 CL0020188 及 CL0020123 抗體相比，參考抗體#1、#2、及#3 達成 EC50 需要更高相對量。

表 8. 抗 TREM2 抗體之特性的比較

抗體	K _D (nM) 人類 TREM2	K _D (nM) Cyno TREM2	EC50，人類 CSF 中之經結合 sTREM2 [nM]	EC50，Cyno CSF 中之經結合 sTREM2 [nM]
CL0020188-4	1.4	1.5	0.29	0.28
CL0020188-7	3.3	2.8	0.75	0.72
CL0020123-5	0.63	9.3	1.00	49.41
CL0020123-7	0.08	9.4	0.54	16.88
參考抗體#1	5.9	14	32.6	81.6
參考抗體#2	4.3	9.2	7.4	6.5
參考抗體#3	8.7	9.2	7.25	33.72

實例 12. 抗 TREM2 抗體之抗原決定基定位

【0302】 為了鑑別肽水準下之抗 TREM2 抗體的抗原決定基，使用氫氙交換 (HDX)質譜法。在 20°C下將單獨或與抗 TREM2 抗體混合之重組人類 TREM2 與氧化氬標記緩衝液(50 mM 磷酸鈉、100 mM 氯化鈉、pH 7.0)一起培育 0、60、600、及 3600 秒。藉由添加等體積 4 M 鹽酸胍 0.85 M TCEP 緩衝液(最終 pH 2.5)來淬滅氫/氙交換。然後使經淬滅樣品經歷胃蛋白酶/蛋白酶 XIII 消化及 LC-MS 分析。簡言之，將經淬滅樣品注入到保持在 20°C下之包裝胃蛋白酶/蛋白酶 XIII 管柱

(2.1 x 30 mm)，且使用包含與 Q Exactive™ HF-Hybrid Quadrupole-Orbitrap 質譜儀(Thermo Fisher)耦合之 Waters Acquity UPLC (Waters Corporation)的 UPLC-MS 系統分析所得肽。該等肽在保持於-6°C下之 50 mm x 1 mm C8 管柱上使用 16.5 分鐘自 2%至 31%溶劑 B 之梯度(溶劑 B：乙腈中之 0.2%甲酸；溶劑 A：水中之 0.2%甲酸)分離。僅在 MS 模式下記錄質譜。使用 HDX Workbench (Pascal 等人 2012. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 23:1512-1521)處理原始 MS 資料。使用氘化肽與其天然形式之間在 t0 時之平均質量差異計算氘水準。經由使用 Mascot 軟體(Matrix Science)對人類 TREM2 序列搜索 MS/MS 資料進行肽鑑別。前驅物及產物離子之質量容差分別為 10 ppm 及 0.02 Da。

【0303】 基於 HDX 質譜法結果，CL0020188 及 CL0020188 之變異體結合至人類 TREM2 (SEQ ID NO:1)之胺基酸殘基 143-149 (FPGESSES (SEQ ID NO:69))，而 CL0020123 及 CL0020123 之變異體結合至人類 TREM2 之(i)胺基酸殘基 55-63 (GEKGPCQRV (SEQ ID NO:70))、(ii)胺基酸 96-107 (TLRNLQPHDAGL (SEQ ID NO:71))、及(iii)胺基酸殘基 126-129 (VEVL (SEQ ID NO:72))。

IX. 非正式序列表

SEQ ID NO	序列	描述
1	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCP YDSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWL LSFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLY QCQSLHGSEADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWF PGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIF LIKILAAASALWAAAWHGQKPGTHPPSELDCGHDPGY QLQTLPLGLRDT	人類 TREM2 蛋白
2	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMS WIRQPPGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRF TISRDNQNLQYLMNTLRAEDTAIYYCARLSYGFDY WGQGVMVTVSS	CL0020306 VH
3	DIVMTQGALPNVPVSGESASITCQSSKSLHSNGKTY LNWYLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSG TDFTLKISSVEAEDVGVIYCCQQFLEFPFTFGSGTKLEI K	CL0020306 VL
4	GFTFTDFYMS	CL0020306 CDR-H1；

SEQ ID NO	序列	描述
		CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-3、 CL0020188-4、 CL0020188-5、 CL0020188-6、 CL0020188-7、及 CL0020188-8 之 CDR-H1
5	VIRNKANGYTAGYNPSVKG	CL0020306 CDR-H2； CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-3、及 CL0020188-4 之 CDR-H2
6	ARLSYGFDY	CL0020306 CDR-H3
7	QSSKSLLSNGKTYLN	CL0020306 CDR-L1； CL0020307 CDR-L1； CL0020307-1 CDR-L1； CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-5、及 CL0020188-6 之 CDR-L1
8	WMSTRAS	CL0020306 CDR-L2； CL0020307 CDR-L2； CL0020307-1 CDR-L2； CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-3、 CL0020188-4、 CL0020188-5、 CL0020188-6、 CL0020188-7、及 CL0020188-8 之 CDR-L2
9	QQFLEFPFT	CL0020306 CDR-L3； CL0020307 CDR-L3； CL0020307-1 CDR-L3
10	EVKLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTN FYMSW	CL0020307 VH

SEQ ID NO	序列	描述
	IRQPPGRAPEWLGVIRNRPNGYTTDYNPSVKGRFTISRDN TQNLILYLMSTLRADDTAFYYCTRLTYGFDYW GQGVMVTVSS	
11	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLLHSNGKTY LNWYLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSG TDFTLKISSVEAEVVG VYYCQQFLEFPFTFGSGTKLEI K	CL0020307 VL
12	GFTFTNFYMS	CL0020307 CDR-H1
13	VIRNRPNGYTTDYNPSVKG	CL0020307 CDR-H2
14	TRLTYGFDY	CL0020307 CDR-H3
15	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMS WIRQPPGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRF TISRDN TQNLILYLMNTLRAEDTAIYYCARLTYGFDY WGQGVMVTVSS	CL0020188 VH
16	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLLHSNGKTY LNWYLQRPQGSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSG TDFTLKISSVEAEDVG VYYCQQFLEYPFTFGSGTKLE IK	CL0020188 VL
17	ARLTYGFDY	CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-3、 CL0020188-4、 CL0020188-5、 CL0020188-6、 CL0020188-7、及 CL0020188-8 之 CDR-H3
18	QQFLEYPFT	CL0020188 及變異體 CL0020188-1、 CL0020188-2、 CL0020188-3、 CL0020188-4、 CL0020188-5、 CL0020188-6、 CL0020188-7、及 CL0020188-8 之 CDR-L3
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSW VRQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFT ISRDN SKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDY WGQGT LTVSS	CL0020188-1 VH； CL0020188-3 VH
20	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCQSSKSLLHSNGKTYL NWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGV PDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQG TKVEI K	CL0020188-1 VL； CL0020188-2 VL； CL0020188-5 VL； CL0020188-6 VL

SEQ ID NO	序列	描述
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	CL0020188-2 VH
22	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISQCSSKSLHSTGKTYL NWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGV PDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEI K	CL0020188-3 VL ; CL0020188-4 VL ; CL0020188-7 VL ; CL0020188-8 VL
23	QSSKSLHSTGKTYLN	變異體 CL0020188-3 、 CL0020188-4 、 CL0020188-7 、 及 CL0020188-8 之 CDR-L1
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	CL0020188-5 VH ; CL0020188-7 VH
25	VIRNKANAYTAGYNPSVKG	變異體 CL0020188-5 、 CL0020188-6 、 CL0020188-7 、 及 CL0020188-8 之 CDR-H2
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQAPGKGPEWLSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	CL0020188-6 VH ; CL0020188-8 VH
27	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFSIEDFYIHWV KQRPEQGLEWIGWIDPENGDSKYAPKFQ GKATMTA DTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCHADHGNYGSTMD YWGQGTSTVTVSS	CL0020123 VH
28	DIQMNQSPSSLSASLGDTV TITCHASQHINVWLSWY QQKPGDHPKLLIYKASN LHTGVPSRFSGSGSGTGFTL TISLQPED IATYYCQQGQTYPRTFGGG TKLEIK	CL0020123 VL
29	GFSIEDFYIH	CL0020123 及變異體 CL0020123-1 、 CL0020123-2 、 CL0020123-3 、 CL0020123-4 、 CL0020123-5 、 CL0020123-6 、 CL0020123-7 、 及 CL0020123-8 之 CDR-H1
30	WIDPENGDSKYAPKFQG	CL0020123 及變異體 CL0020123-1 及 CL0020123-2 之

SEQ ID NO	序列	描述
		CDR-H2
31	HADHGNYGSTMDY	CL0020123 及變異體 CL0020123-1、 CL0020123-2、 CL0020123-3、 CL0020123-4、 CL0020123-5、 CL0020123-6、 CL0020123-7、及 CL0020123-8 之 CDR-H3
32	HASQHINVWLS	CL0020123 及變異體 CL0020123-1、 CL0020123-2、 CL0020123-3、 CL0020123-4、 CL0020123-5、 CL0020123-6、 CL0020123-7、及 CL0020123-8 之 CDR-L1
33	KASNLHT	CL0020123 及變異體 CL0020123-1、 CL0020123-2、 CL0020123-3、 CL0020123-4、 CL0020123-5、 CL0020123-6、 CL0020123-7、及 CL0020123-8 之 CDR-L2
34	QQGQTYPRT	CL0020123 及變異體 CL0020123-1、 CL0020123-2、 CL0020123-3、 CL0020123-4、 CL0020123-5、 CL0020123-6、 CL0020123-7、及 CL0020123-8 之 CDR-L3
35	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPENGDSKYAPKFQGRATIT ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCHADHGNYGSTM	CL0020123-1 VH

SEQ ID NO	序列	描述
	DYWGQGTLVTVSS	
36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQHINWLSWY QQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQGQTYPRTFGQGTKVEIK	CL0020123-1 VL ; CL0020123-2 VL ; CL0020123-3 VL ; CL0020123-4 VL CL0020123-5 VL ; CL0020123-6 VL ; CL0020123-7 VL ; CL0020123-8 VL
37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPENGD SKYAPKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-2 VH
38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPEQGDSKYAPKFQGRATIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-3 VH
39	WIDPEQGDSKYAPKFQG	變異體 CL0020123-3 及 CL0020123-6 之 CDR-H2
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPENGE SKYAPKFQGRATIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-4 VH
41	WIDPENGE SKYAPKFQG	變異體 CL0020123-4 及 CL0020123-7 之 CDR-H2
42	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPEQGESKYAPKFQGRATIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-5 VH
43	WIDPEQGESKYAPKFQG	變異體 CL0020123-5 及 CL0020123-8 之 CDR-H2
44	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPEQGDSKYAPKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-6 VH
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPENGE SKYAPKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-7 VH
46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSIEDFYIHW VRQAPGQGLEWMGWIDPEQGESKYAPKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCHADHGNYGSTM DYWGQGTLVTVSS	CL0020123-8 VH
47	W-I-D-P-E-β ₆ -G-β ₈ -S-K-Y-A-P-K-F-Q-G，其中 β ₆ 為 N	CDR-H2 共通序列

SEQ ID NO	序列	描述
	或 Q 且 β_8 為 D 或 E	
48	G-F-T-F-T- α_6 -F-Y-M-S，其中 α_6 為 D 或 N	CDR-H1 共通序列
49	V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G，其中 β_5 為 K 或 R； β_6 為 A 或 P； β_8 為 G 或 A； β_{11} 為 A 或 T；且 β_{12} 為 G 或 D	CDR-H2 共通序列
50	γ_1 -R-L- γ_4 -Y-G-F-D-Y，其中 γ_1 為 A 或 T；且 γ_4 為 T 或 S	CDR-H3 共通序列
51	Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N，其中 δ_{10} 為 N 或 T	CDR-L1 共通序列
52	Q-Q-F-L-E- ϕ_6 -P-F-T，其中 ϕ_6 為 Y 或 F	CDR-L3 共通序列
53	AGGAATGTGGGGAGCACGGAG	引子序列
54	TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG	引子序列
55	ACCCTAGTCCTGACTGTTGCTC	引子序列
56	TATAGGAACCTTCGCGACACGGACAC	引子序列
57	ACAGGAGGGACCTACCTTCAG	引子序列
58	GCCTGCCTTTCAGAGACCTCAGTC	引子序列
59	CCTCTCCGGCTGCTCATC TTA	引子序列
60	GTCTCTCAGCCCTGGCAGAGTTTG	引子序列
61	CGCCTACCTAGTCCTGACTGTTG	引子序列
62	AAAGCCTACAGCATCCTCACCTC	引子序列
63	GCATCATGGGGTTGTAGATTCCG	引子序列
64	GGGS	連接子序列
65	HHHHHH	6X-His 標籤
66	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMH WVKQSPGRGLEWIGRSDPTTGGTNYNEKFKTKATLT VDKPSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCVRTSGTGDYWG QGTSLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVT	抗 TREM2 抗體 RS9.F6 之 VH
67	DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHNNGNTF LHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTHVPPTFGGGTKLE IKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCF	抗 TREM2 抗體 RS9.F6 之 VL
68	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQSSKSLLSHNGKTY LNWYQQKPGQPPLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFLEFPFTFGQGTV EIK	CL0020307-1 VL
69	FPGESES	TREM2 抗原決定基
70	GEKGPCQRV	TREM2 抗原決定基
71	TLRNLQPHDAGL	TREM2 抗原決定基
72	VEVL	TREM2 抗原決定基
73	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISNWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQVGVPLRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQADSFPRNFGQGTKLEIK	參考抗體#1 VL
74	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGHSFTNYWIAW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAVYFCARQRTFYDSSGY FDYWGGQGLTVTVSS	參考抗體#1 VH

SEQ ID NO	序列	描述
75	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYFCQQADSFPRTFGQGTKLEIK	參考抗體#2 VL
76	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAW VRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYFCARQRTFYDSSD YFDYWGQGTLVTVSS	參考抗體#2 VH
77	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVHSNRYTY LHWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTKLE IK	參考抗體#3 VL
78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMN WVRQAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTIT ADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLLRNQPGESY AMDYWGQGTLVTVSS	參考抗體#3 VH
79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSW VRQAPGKGPEWLSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDY WGQGTLVTVSS	CL0020188-4 VH

【序列表】

<110> 美商戴納立製藥公司(DENALI THERAPEUTICS INC.)

<120> 抗TREM2抗體及其使用方法

<130> 102342-003310PC-1173316

<140>

<141>

<150> 62/808,141

<151> 2019-02-20

<160> 83

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 230

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Glu Pro Leu Arg Leu Leu Ile Leu Leu Phe Val Thr Glu Leu Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Asn Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser Leu
20 25 30

Gln Val Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg Lys
35 40 45

Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Val
50 55 60

Ser Thr His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Asn Gly
65 70 75 80

Ser Thr Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile Thr
85 90 95

Leu Arg Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser

100

105

110

Leu His Gly Ser Glu Ala Asp Thr Leu Arg Lys Val Leu Val Glu Val

115120125

Leu Ala Asp Pro Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe Pro

130135140

Gly Glu Ser Glu Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile Ser

145150155160

Arg Ser Leu Leu Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser Ile Leu

165170175

Leu Leu Leu Ala Cys Ile Phe Leu Ile Lys Ile Leu Ala Ala Ser Ala

180185190

Leu Trp Ala Ala Ala Trp His Gly Gln Lys Pro Gly Thr His Pro Pro

195200205

Ser Glu Leu Asp Cys Gly His Asp Pro Gly Tyr Gln Leu Gln Thr Leu

210215220

Pro Gly Leu Arg Asp Thr

225230

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 2

Glu Val Lys Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe

20

25

30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu

354045

Gly Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro

505560

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile

65707580

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

859095

Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val

100105110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly

151015

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

202530

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

354045

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser

50					55					60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe
				85					90					95	
Leu	Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 5
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 6

Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 7

Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 8

Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 9

Gln Gln Phe Leu Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 10
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Arg Asn Arg Pro Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Phe Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Ser Val Glu Ala Glu Val Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 12
Gly Phe Thr Phe Thr Asn Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 13

Val Ile Arg Asn Arg Pro Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 14

Thr Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 15

Glu Val Lys Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 17
Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 18
Gln Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 19
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Thr Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 23

Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 25
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu
 35 40 45

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 28
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asp His Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 29
Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe Tyr Ile His
1 5 10

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 30
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 31
His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 32
His Ala Ser Gln His Ile Asn Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 33
Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 34
Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 35
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

I879756

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Arg

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 38
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 39
Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 40
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 41
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 42
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

I879756

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 43
Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 45
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 46
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Glu Asp Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Gln Gly Glu Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Ala Asp His Gly Asn Tyr Gly Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /置換="Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /置換="Glu"

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(17)
<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 47
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /置換="Asn"

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(10)
<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 48
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /置換="Arg"

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /置換="Pro"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /置換="Ala"

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /置換="Thr"

<220>
<221> VARIANT

<222> (12)..(12)
<223> /置換="Asp"

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(19)
<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 49
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /置換="Thr"

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /置換="Ser"

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(9)
<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 50
Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 51
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /置換="Thr"

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(16)

<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 51

Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /置換="Phe"

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(9)

<223> /注="序列中給出之變異體殘基關於變異體位置之注解中之彼等變異體殘基無偏好"

<400> 52

Gln Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 53

aggaatgtgg ggagcacgga g 21

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 54

tgcacgcacat tgtctgagta ggtg 24

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 55

accctagtcc tgactgttgc tc 22

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> source

<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 56

tataggaact tcgcgacacg gacac 25

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 57
acaggaggga cctaccttca g 21

<210> 58
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 58
gcctgccttt cagagacctc agtc 24

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 59
cctctccggc tgctcatctt actc 24

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 60
gtctctcagc cctggcagag ttg 24

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 61
cgcctaccct agtcctgact gttg 24

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 62
aaagcctaca gcatcctcac etc 23

<210> 63
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成引子"

<400> 63
gcatcatggg gttgtagatt ccg 23

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 64
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成6xHis tag"

<400> 65
His His His His His His
1 5

<210> 66
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 66
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ser Asp Pro Thr Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Thr Ser Gly Thr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
130 135 140

<210> 67
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 67
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
130 135 140

<210> 68
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 68
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 69
Phe Pro Gly Glu Ser Glu Ser
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 70
Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val
1 5

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 71
Thr Leu Arg Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu
1 5 10

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 72
Val Glu Val Leu
1

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Val Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Arg
 85 90 95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 74
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly His Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Thr Phe Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 75
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 76
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 76
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Thr Phe Tyr Tyr Asp Ser Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 77
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 78
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 78
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Gln
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gly Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Leu Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 80
Asn Gly Asp Ser
1

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 81
Gln Gly Asp Ser
1

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 82
Asn Gly Glu Ser
1

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> source
<223> /注="人工序列之描述：合成肽"

<400> 83

I879756

Gln Gly Glu Ser
1

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種特異性結合到人類 TREM2 之經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

- (a) CDR-H1 序列，其具有序列 G-F-T-F-T-D-F-Y-M-S (SEQ ID NO:4)；
- (b) CDR-H2 序列，其具有序列 V-I-R-N- β_5 - β_6 -N- β_8 -Y-T- β_{11} - β_{12} -Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:49)，其中 β_5 為 K； β_6 為 A； β_8 為 G 或 A； β_{11} 為 A；且 β_{12} 為 G；
- (c) CDR-H3 序列，其具有序列 A-R-L-T-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:17)，；
- (d) CDR-L1 序列，其具有序列 Q-S-S-K-S-L-L-H-S- δ_{10} -G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:51)，其中 δ_{10} 為 N 或 T；
- (e) CDR-L2 序列，其具有序列 W-M-S-T-R-A-S (SEQ ID NO:8)；及
- (f) CDR-L3 序列，其具有序列 Q-Q-F-L-E-Y-P-F-T (SEQ ID NO:18)。

【請求項 2】 如請求項 1 之經分離抗體或抗原結合片段，其中：

- (a) 該 CDR-H2 序列選自 SEQ ID NO:5 及 25 中之任一者；且/或
- (b) 該 CDR-L1 序列選自 SEQ ID NO:7 及 23 中之任一者。

【請求項 3】 如請求項 1 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 具有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及具有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或
- (b) 具有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:5 之 CDR-H2、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、具有胺基酸

序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及具有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(c) 具有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之 CDR-L1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及具有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3；或

(d) 具有胺基酸序列 SEQ ID NO:4 之 CDR-H1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:25 之 CDR-H2、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:17 之 CDR-H3、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:23 之 CDR-L1、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之 CDR-L2 及具有胺基酸序列 SEQ ID NO:18 之 CDR-L3。

【請求項 4】 如請求項 1 之經分離抗體或抗原結合片段，其包含具有 SEQ ID NO:15、19、21、24、26、及 79 中之任一者的 V_H 序列。

【請求項 5】 如請求項 4 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_H 序列具有 SEQ ID NO:15。

【請求項 6】 如請求項 4 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_H 序列具有 SEQ ID NO:24。

【請求項 7】 如請求項 4 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_H 序列具有 SEQ ID NO:79。

【請求項 8】 如請求項 1 之經分離抗體或抗原結合片段，其包含具有 SEQ ID NO:16、20、及 22 中之任一者的 V_L 序列。

【請求項 9】 如請求項 8 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_L 序列具有 SEQ ID NO:16。

【請求項 10】 如請求項 8 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_L 序列具有 SEQ ID NO:22。

【請求項 11】 如請求項 8 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該 V_L 序列具有 SEQ ID NO:20。

【請求項 12】 如請求項 1 之經分離抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含：

- (a) 具有 SEQ ID NO:15 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:16 之 V_L ；或
- (b) 具有 SEQ ID NO:19 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (c) 具有 SEQ ID NO:21 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (d) 具有 SEQ ID NO:19 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (e) 具有 SEQ ID NO:79 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (f) 具有 SEQ ID NO:24 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (g) 具有 SEQ ID NO:26 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:20 之 V_L ；或
- (h) 具有 SEQ ID NO:24 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:22 之 V_L ；或
- (i) 具有 SEQ ID NO:26 之 V_H 序列及具有 SEQ ID NO:22 之 V_L 。

【請求項 13】 如請求項 1 至 12 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段，其中：

- (a) 該抗體或其抗原結合片段降低可溶性 TREM2 蛋白(sTREM2)之水準；
- (b) 該抗體或其抗原結合片段增強 TREM2 活性；且/或
- (c) 該抗體或其抗原結合片段表現出與獼猴 TREM2 蛋白之交叉反應性。

【請求項 14】 如請求項 13 之經分離抗體或其抗原結合片段，其中：

(i) 該抗體或其抗原結合片段增強吞噬作用或增強骨髓細胞、小神經膠質細胞或巨噬細胞之遷移、分化、功能或存活；且/或

(ii) 該抗體或其抗原結合片段增強 Syk 磷酸化。

【請求項 15】 如請求項 14 之經分離抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段增強小神經膠質細胞功能而不增加神經炎症；且/或

其中該抗體或其抗原結合片段在 TREM2 配體存在下增強 Syk 磷酸化。

【請求項 16】 如請求項 1 至 12 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段，其中：

(a) 該抗體為單株抗體；

(b) 該抗體為嵌合抗體；

(c) 該抗體為人源化抗體；或

(d) 該抗原結合片段為 Fab、F(ab')₂、scFv、或二價 scFv。

【請求項 17】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 16 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段，及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項 18】 一種套組，其包含：

如請求項 1 至 16 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段或如請求項 17 之醫藥組成物；及

其使用說明書。

【請求項 19】 一種如請求項 1 至 16 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段或如請求項 17 之醫藥組成物的用途，其係用於製備治療個體之神經退化性疾病的醫藥品。

【請求項 20】 如請求項 19 的用途，其中該神經退化性疾病選自由以下組成之群：阿茲海默氏病、原發性年齡相關 tau 蛋白病、進行性核上性麻痺(PSP)、

額顳葉型癡呆、額顳葉型癡呆伴與染色體 17 相關之帕金森症、嗜銀顆粒性癡呆、肌萎縮側索硬化症、肌萎縮側索硬化症/關島型帕金森氏症-癡呆綜合症(ALS-PDC)、皮質基底核退化症、慢性創傷性腦病、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳擊員癡呆、具有鈣化之擴散性神經原纖維纏結、唐氏症候群、家族性英國型癡呆、家族性丹麥型癡呆、格施謝三氏症(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、球狀神經膠 tau 蛋白病、瓜達洛普帕金森氏病伴癡呆(Guadeloupean parkinsonism with dementia)、瓜達洛普PSP、哈-斯二氏病(Hallewörden-Spatz disease)、遺傳性彌漫性腦白質病伴癡呆(HDLS)、杭丁頓氏病、包涵體肌炎、多系統萎縮症、肌強直性營養不良、Nasu-Hakola 病、神經原纖維纏結佔優性癡呆、C 型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease type C)、蒼白球-腦橋-黑質變性(pallido-ponto-nigral degeneration)、帕金森氏病、皮克氏病(Pick's disease)、腦炎後帕金森氏症、朊病毒蛋白大腦澱粉樣血管病、進行性皮層下神經膠瘤病、亞急性硬化性全腦炎及僅纏結性癡呆(tangle only dementia)。

【請求項 21】 一種如請求項 1 至 16 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段或如請求項 17 之醫藥組成物的用途，其係用於製備在患有神經退化性疾病之個體中降低 sTREM2 水準或增強 TREM2 活性的醫藥品。

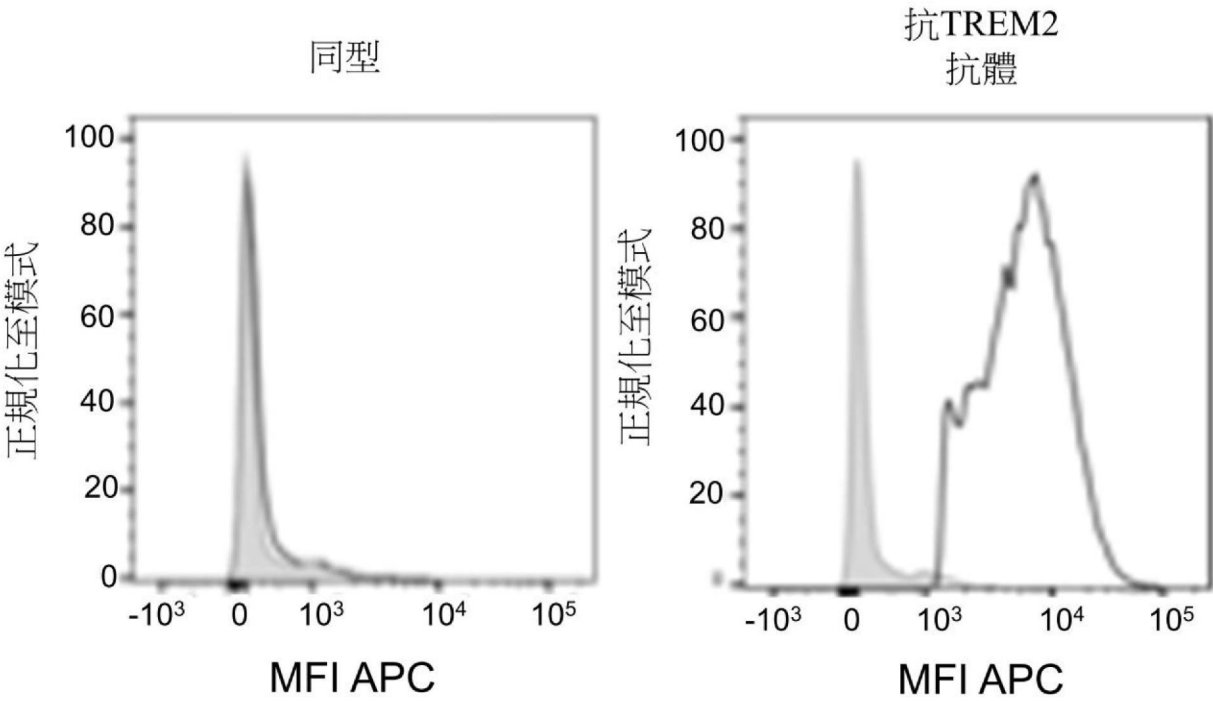
【請求項 22】 一種聚核苷酸，其包含編碼如請求項 1 至 16 中任一項之經分離抗體或其抗原結合片段之核酸序列。

【請求項 23】 一種載體，其包含如請求項 22 之聚核苷酸。

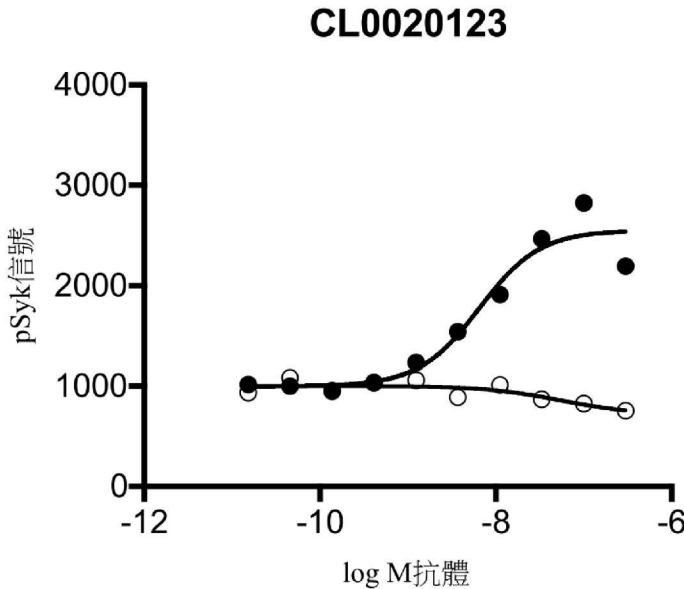
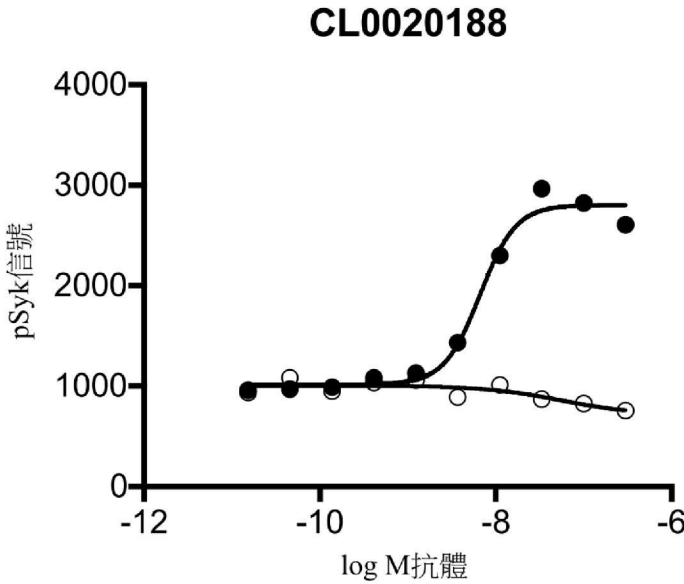
【請求項 24】 一種宿主細胞，其包含如請求項 22 之聚核苷酸或如請求項 23 之載體。

【請求項 25】 一種製造抗 TREM2 抗體的方法，其包含在適用於表現抗體之條件下培養如請求項 24 之宿主細胞。

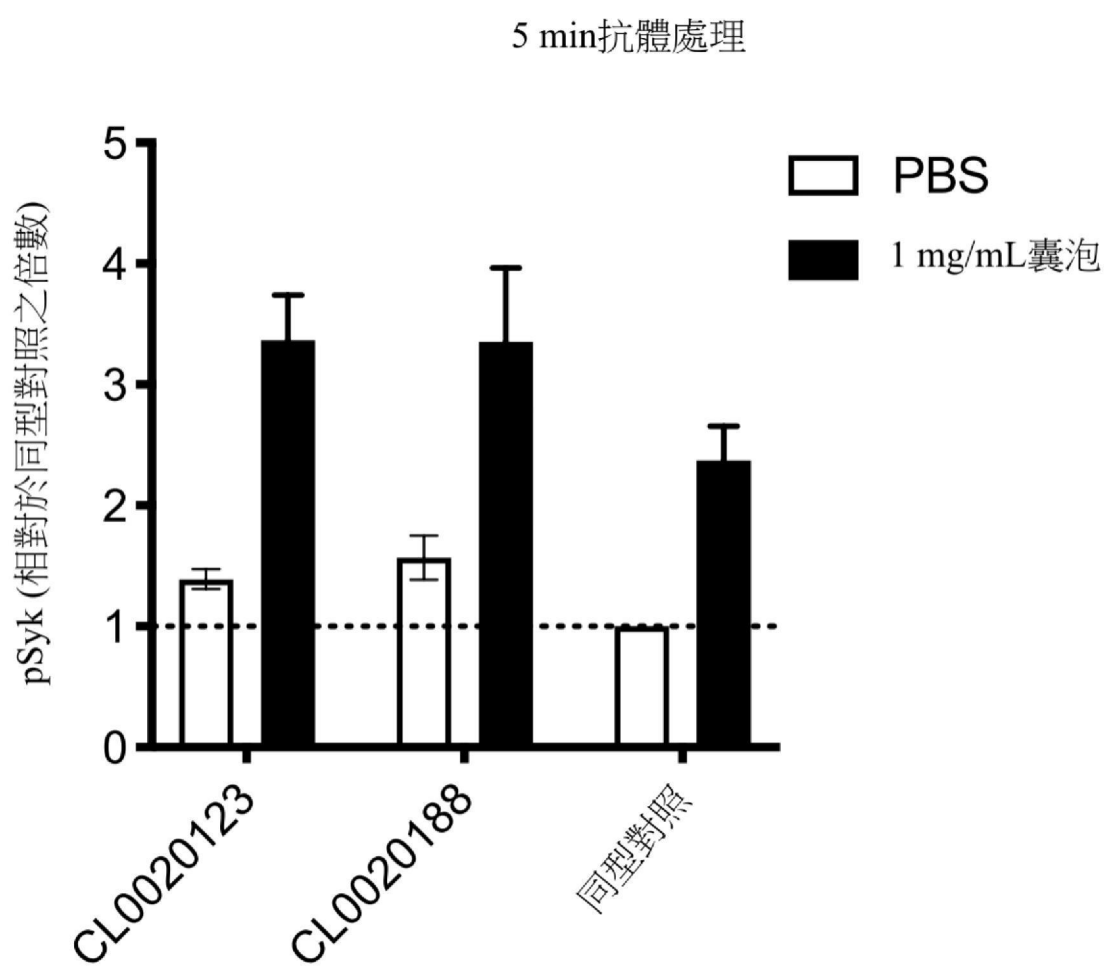
【發明圖式】



【圖 1】

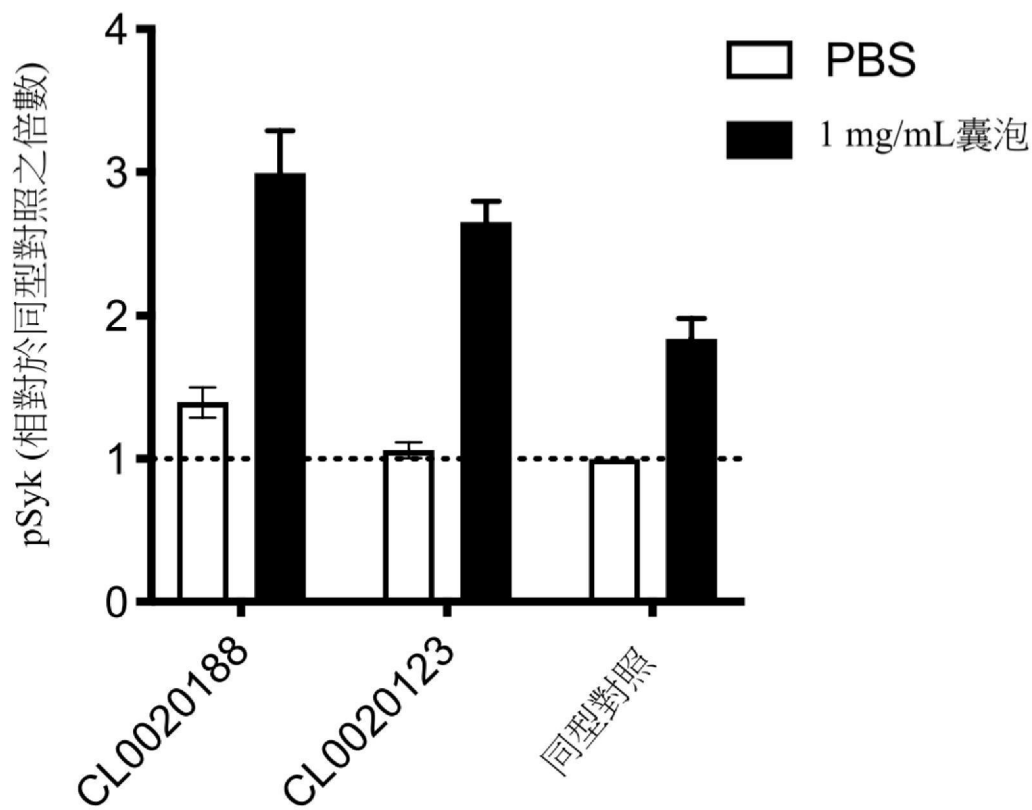


【圖 2】

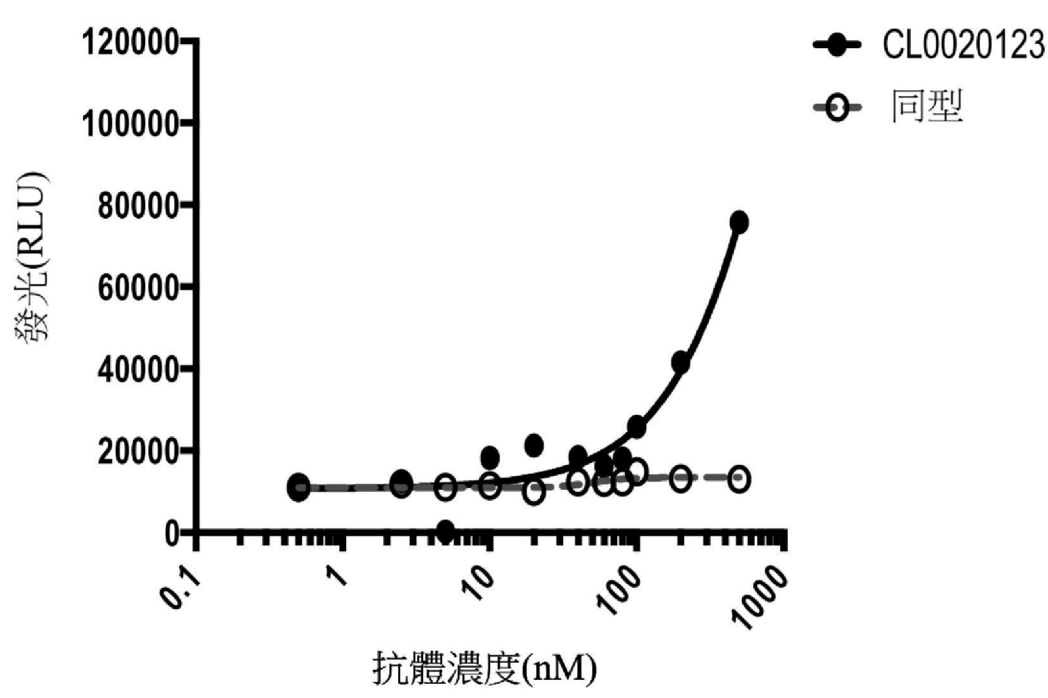
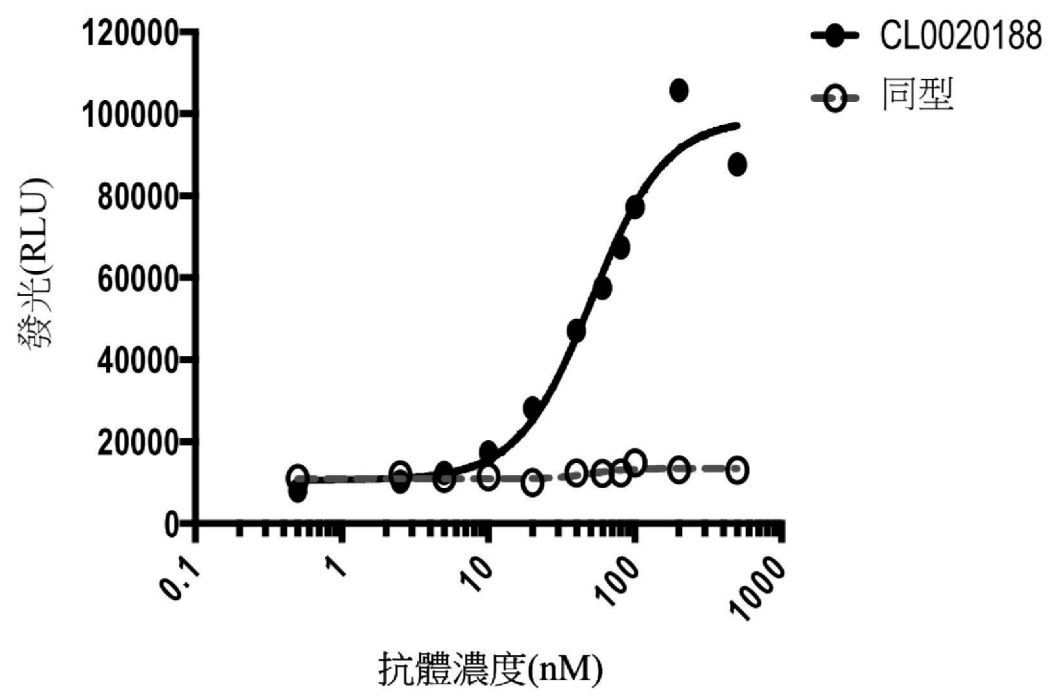


【圖 3A】

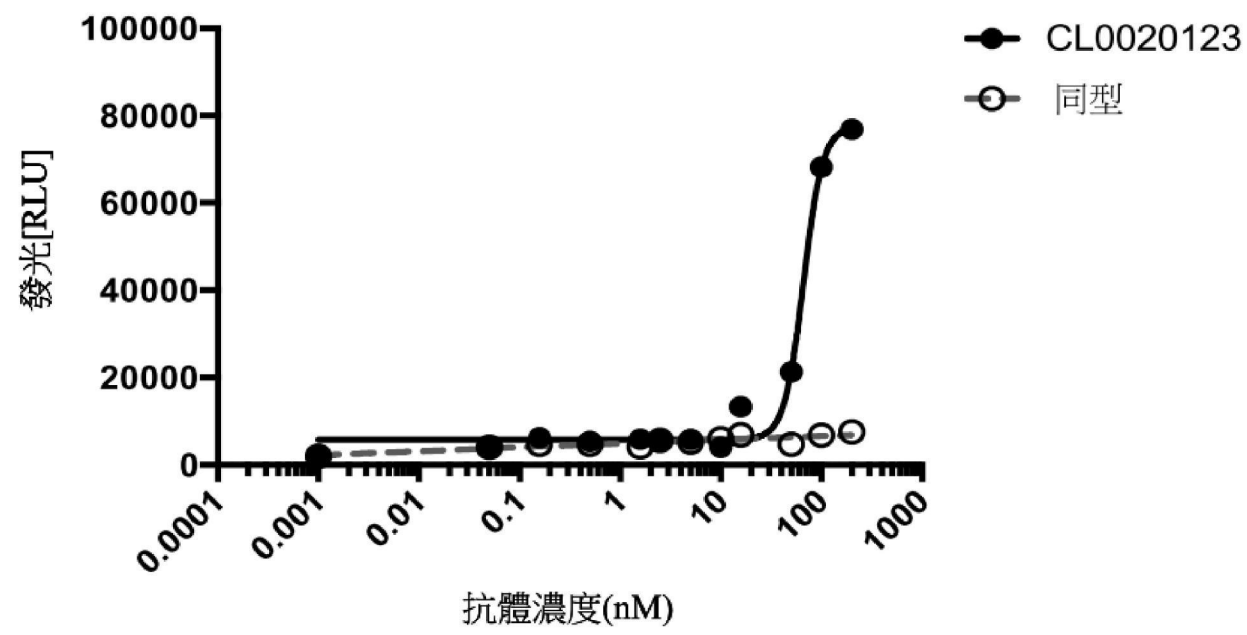
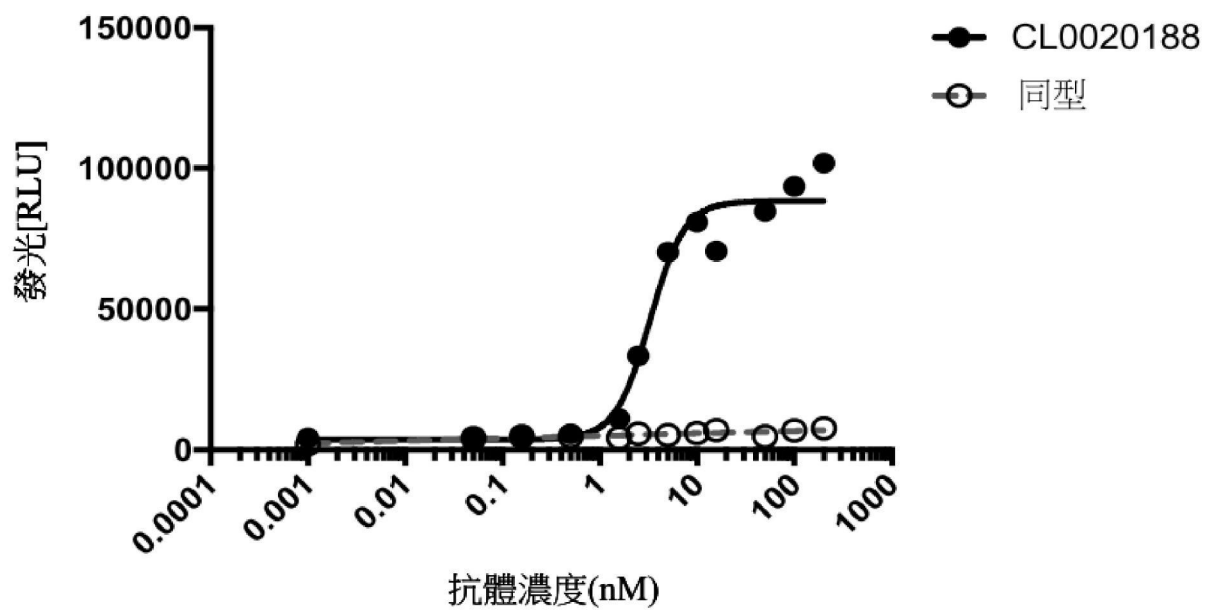
24 h抗體處理



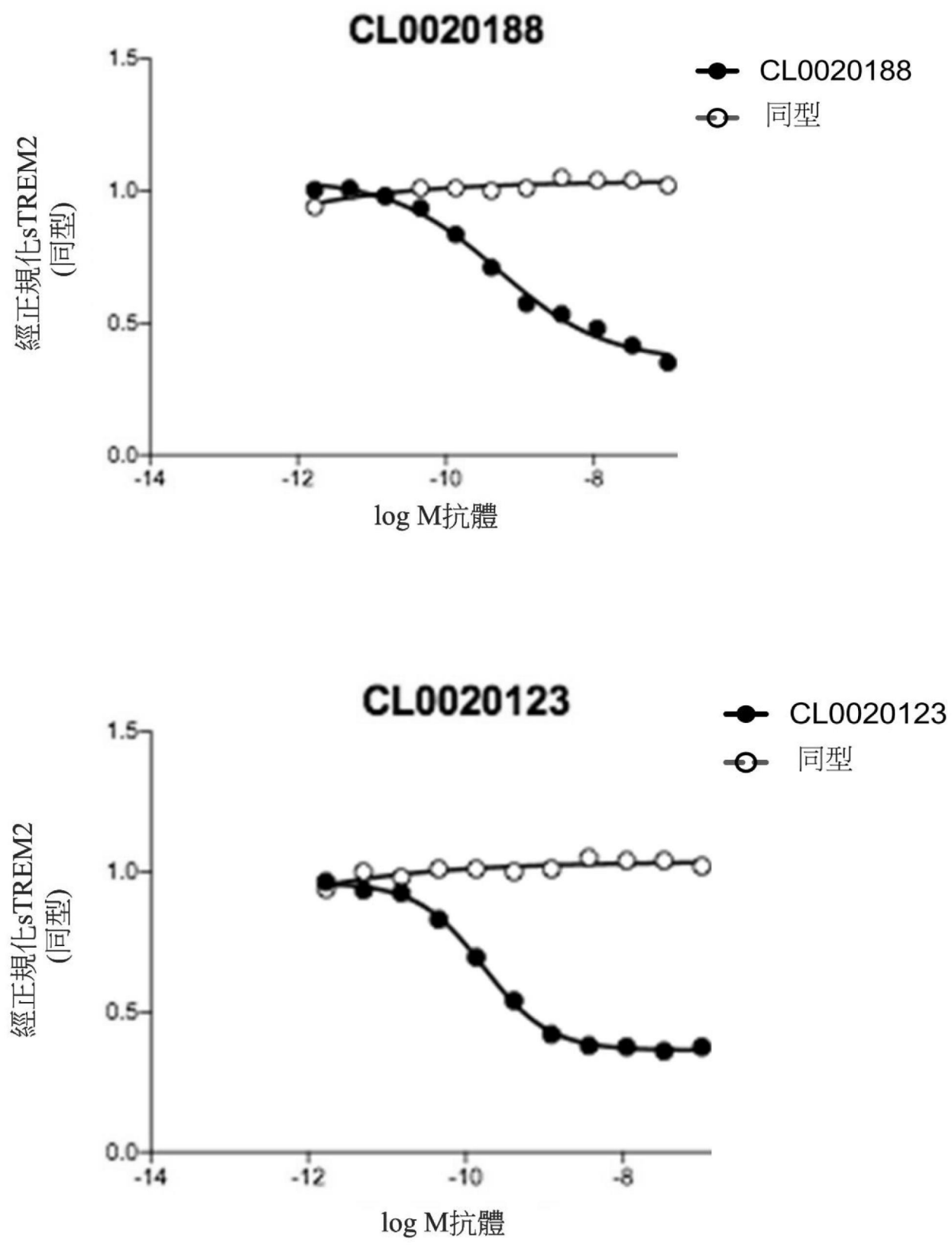
【圖 3B】



【圖 4】

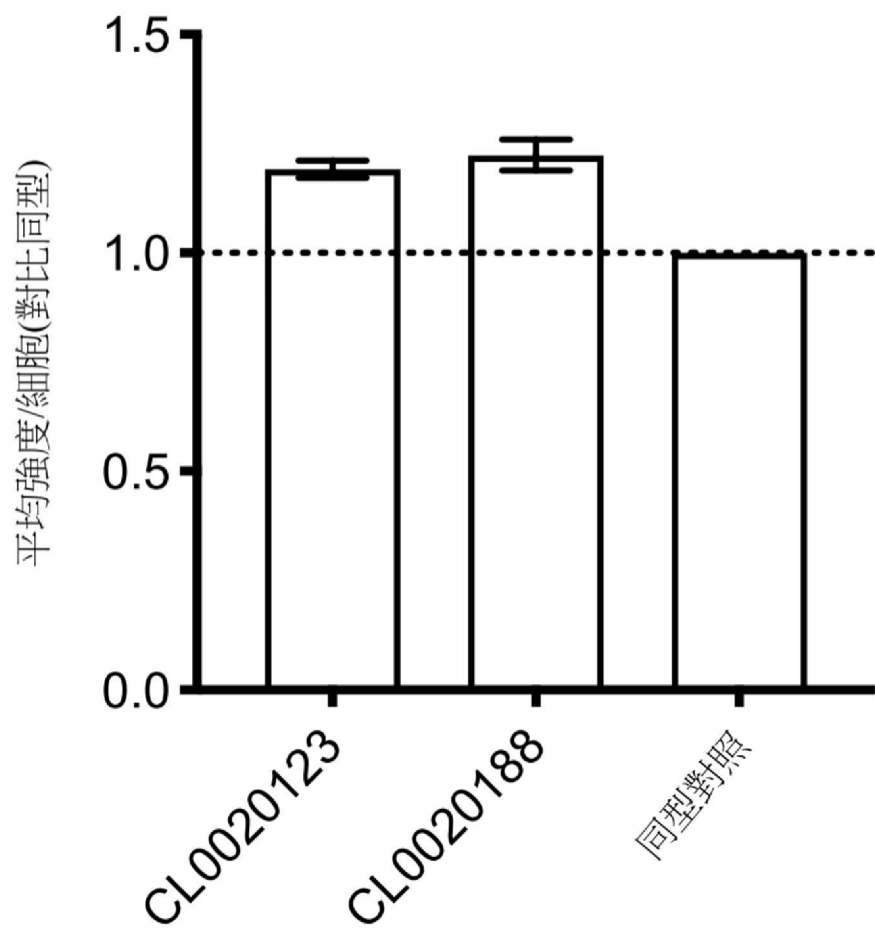


【圖 5】

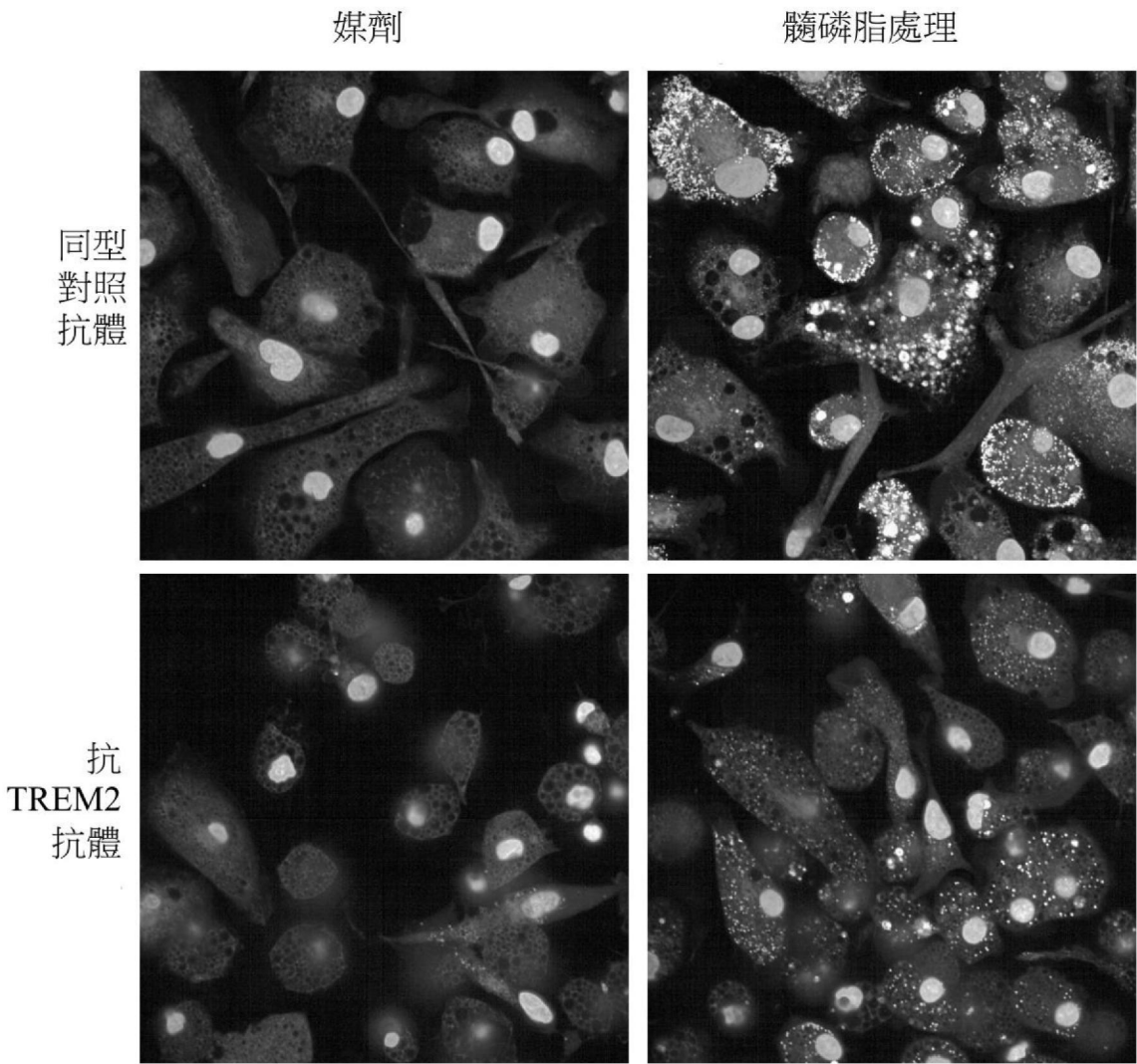


【圖 6】

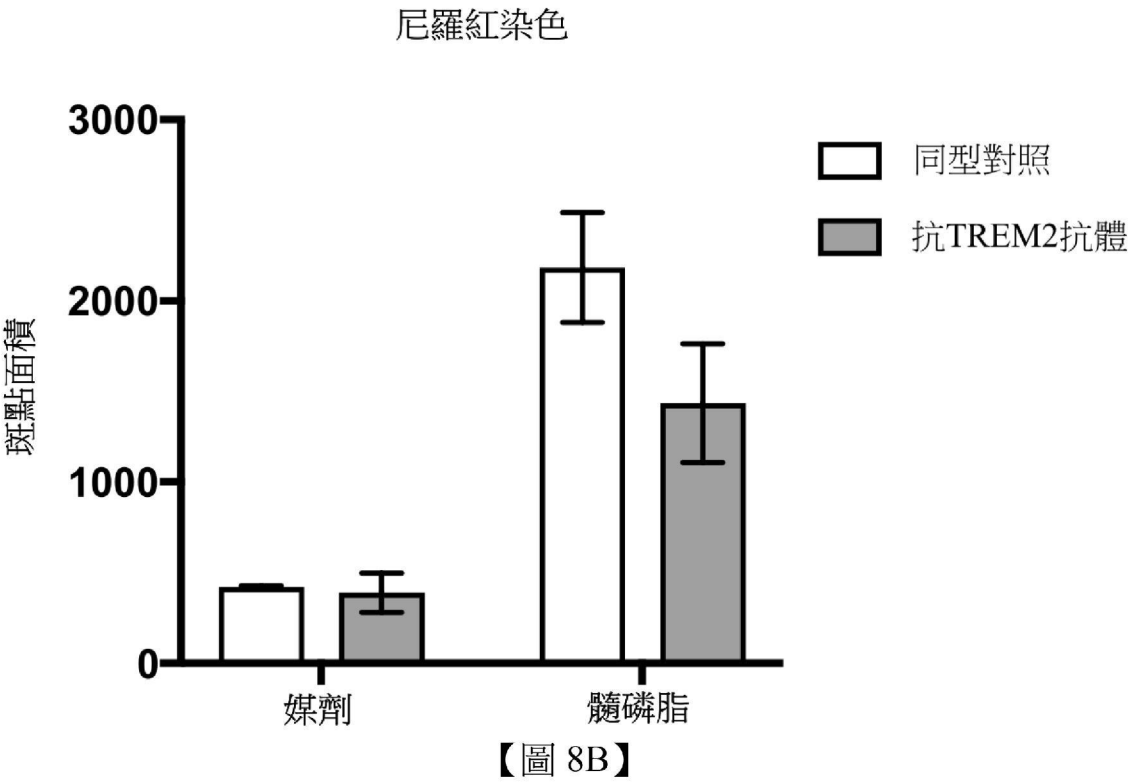
髓磷脂吞噬作用-人類巨噬細胞
100nM抗體，24h
平均值，SEM，n=2-10個生物重複

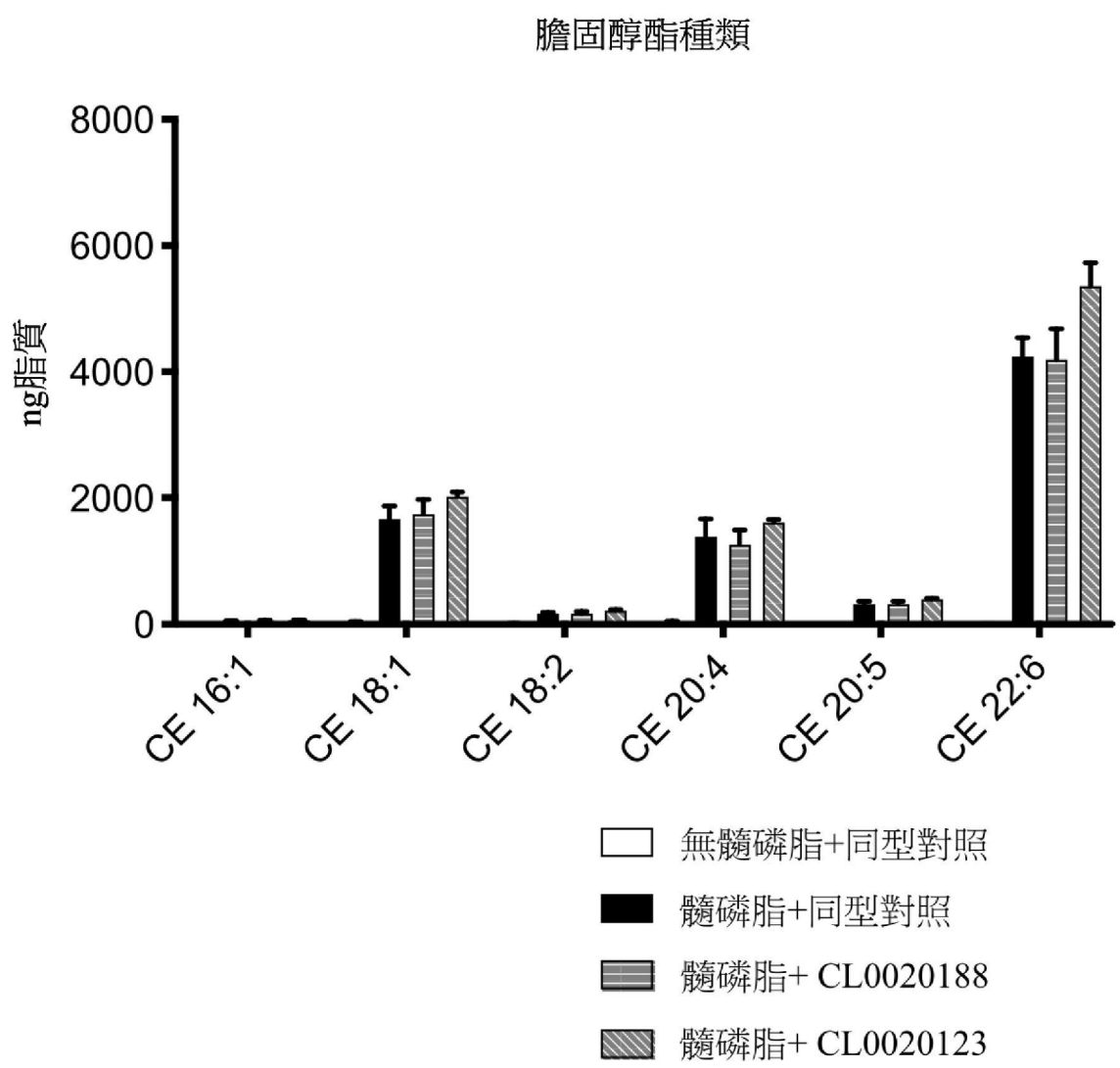


【圖 7】

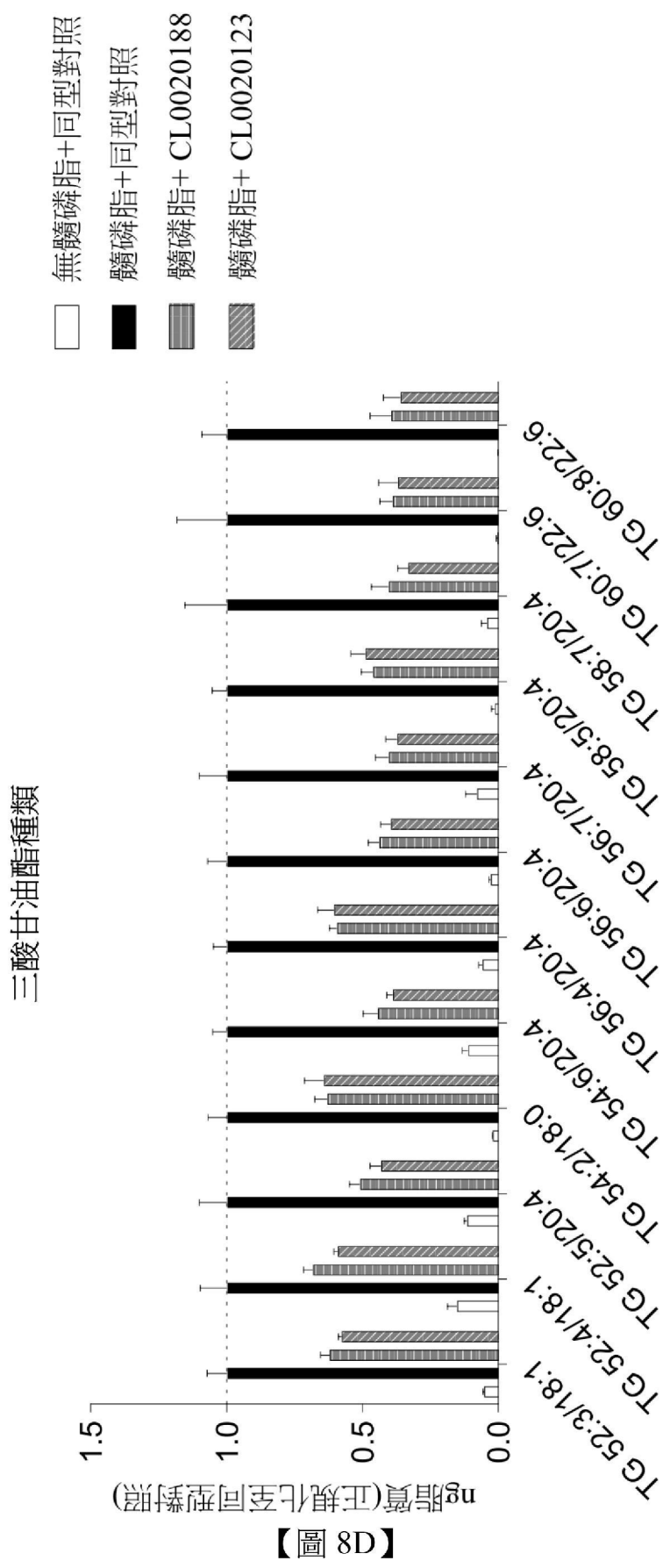


【圖 8A】

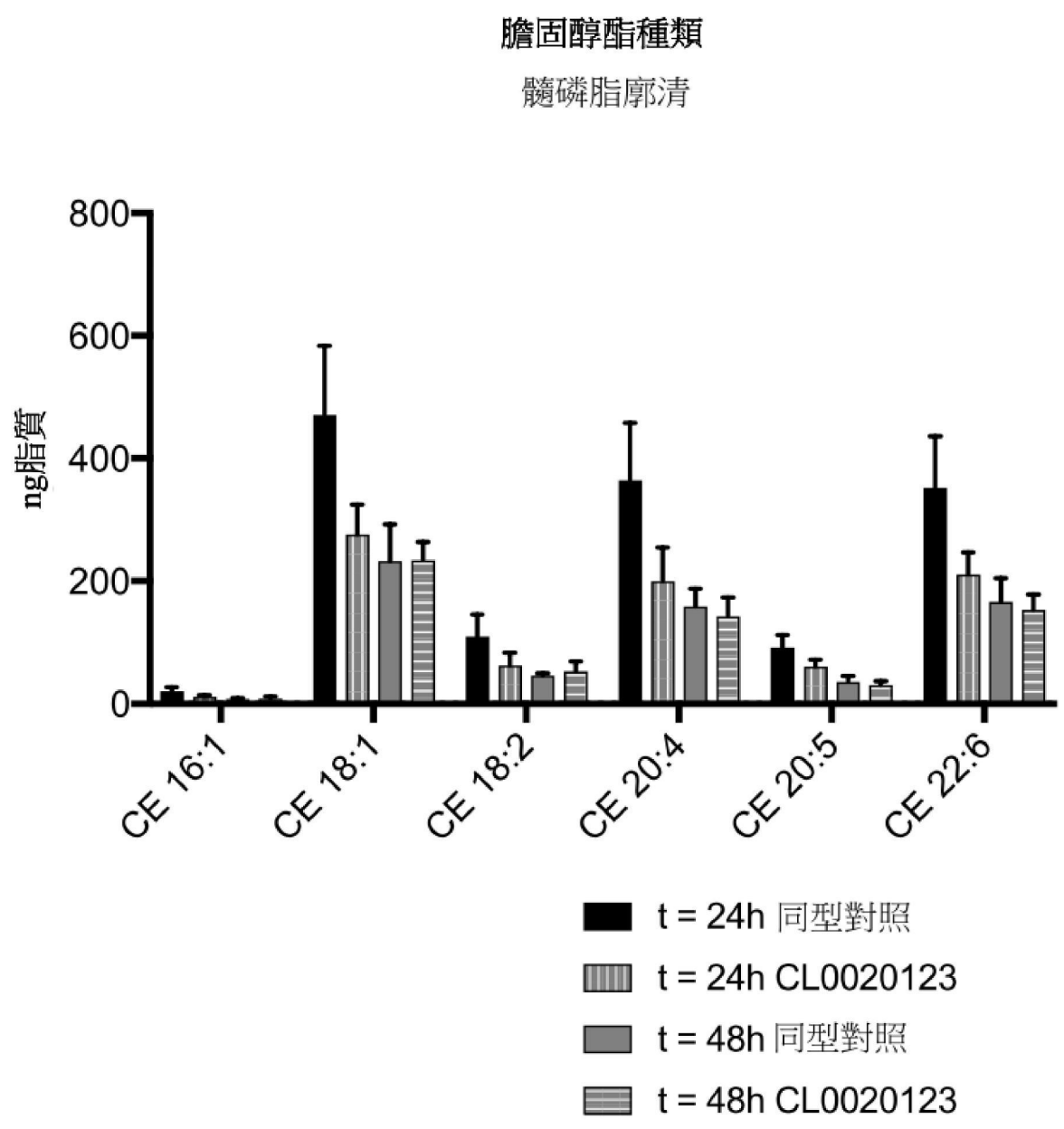




【圖 8C】

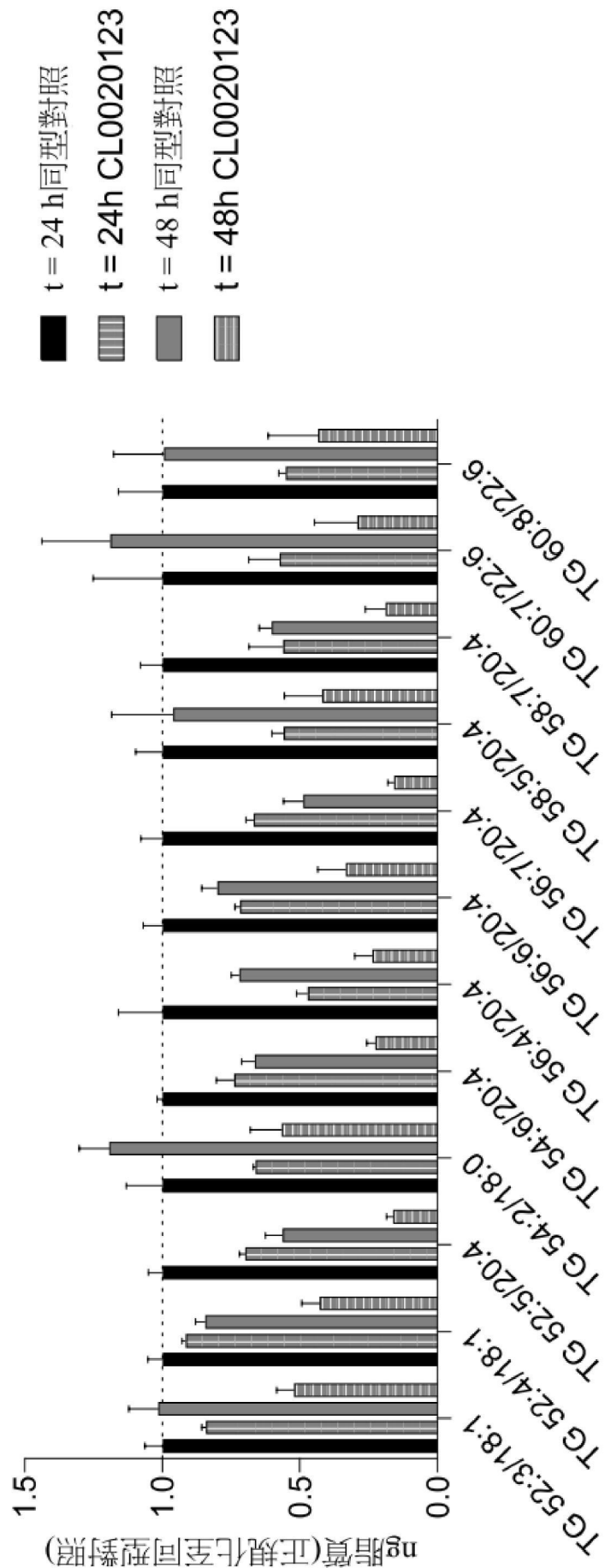


【圖 8D】

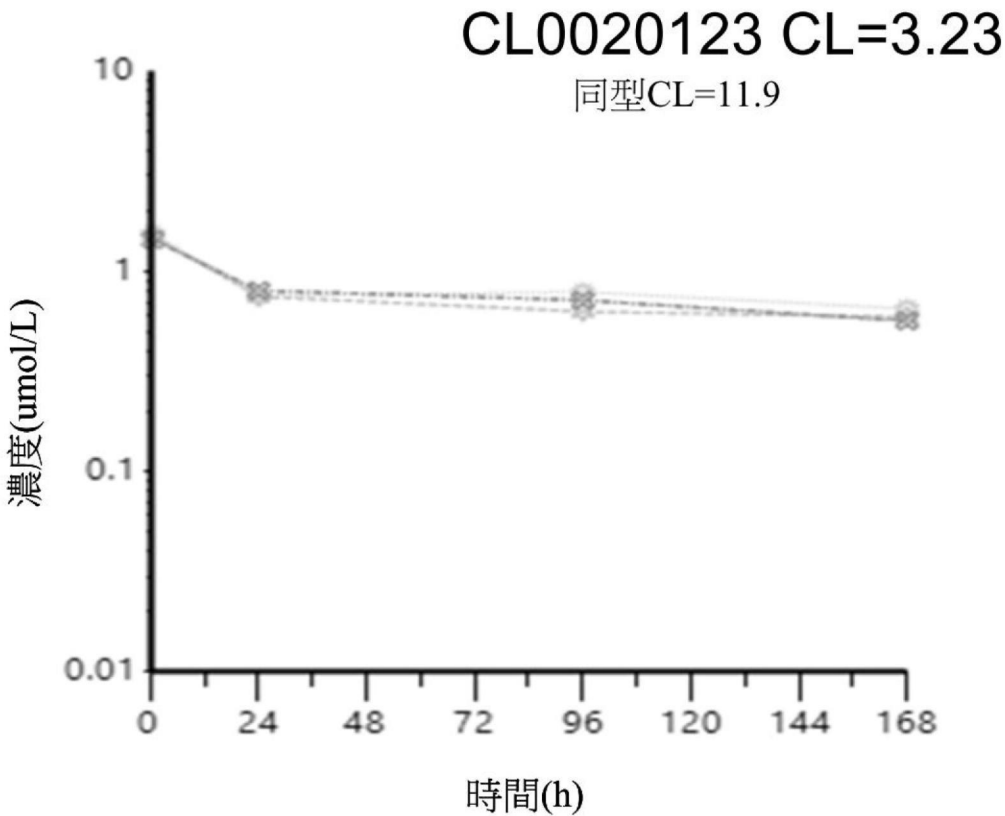
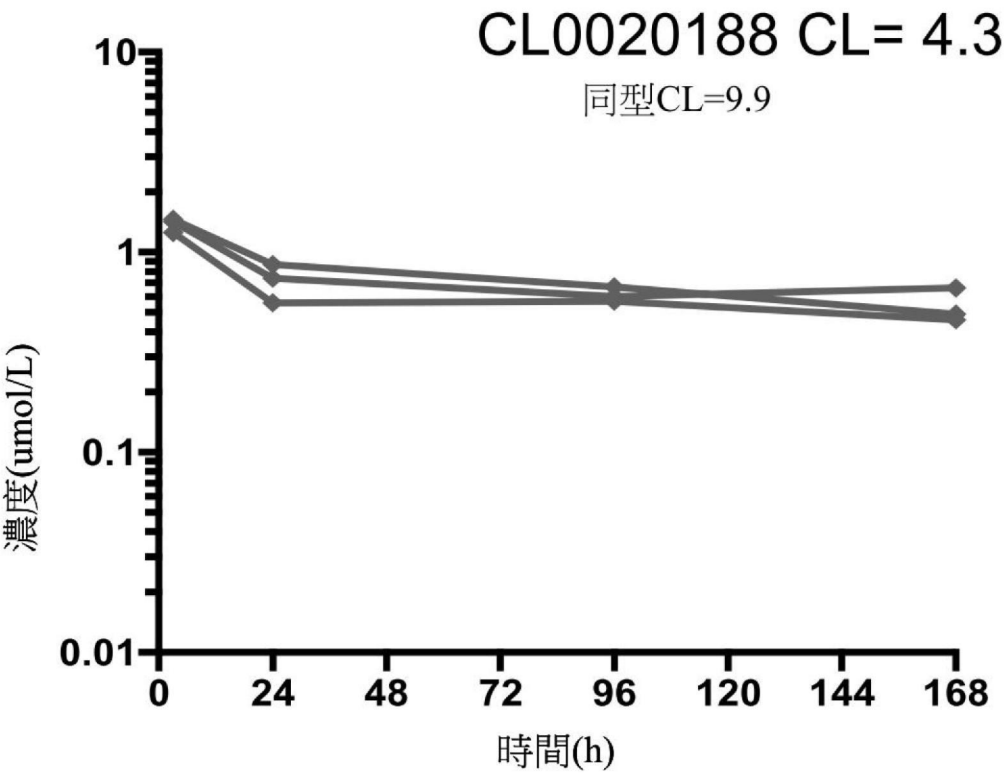


【圖 8E】

三酸甘油酯種類
髓磷脂廓清

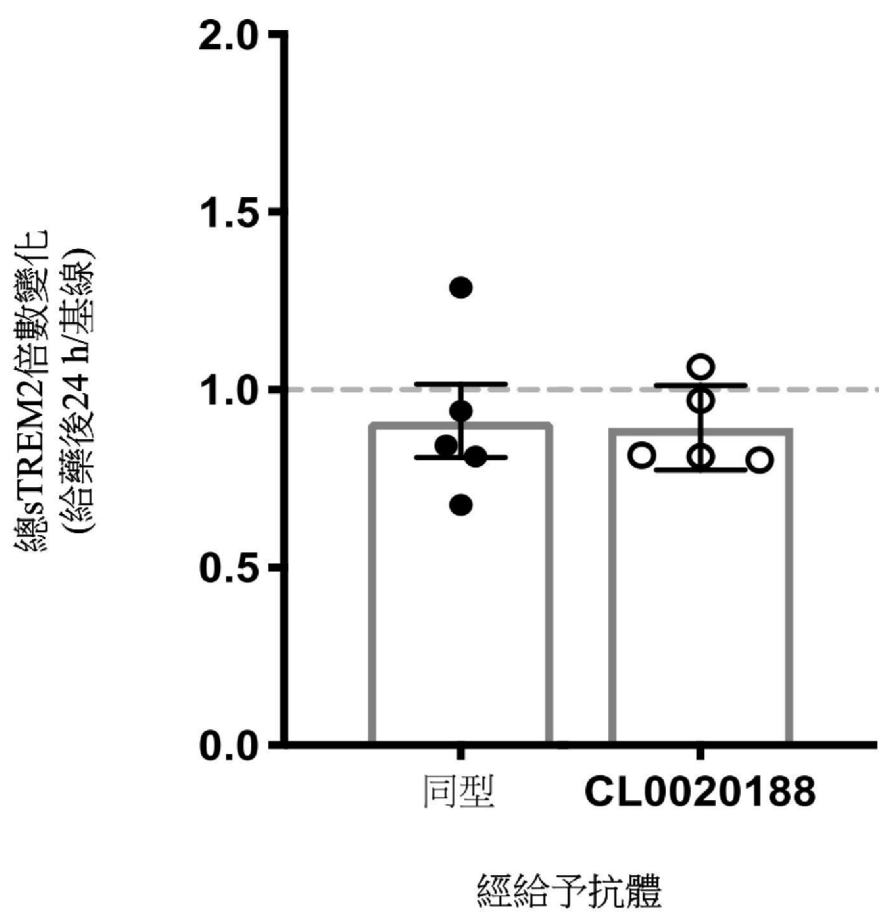


【圖 8F】



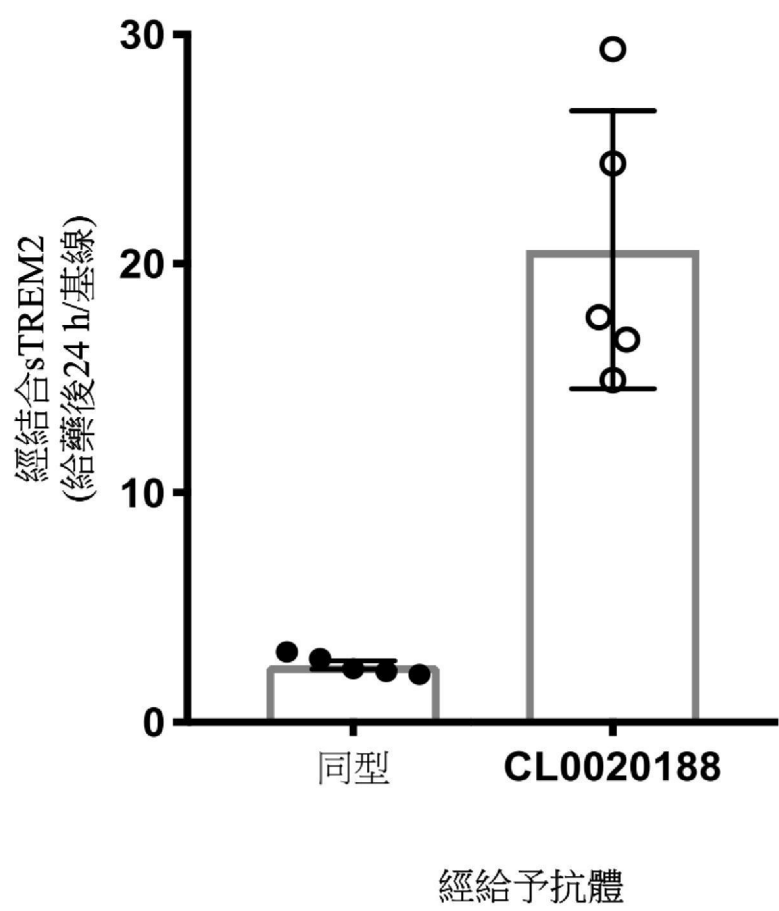
【圖 9】

hTREM2敲入小鼠血漿中之
總sTREM2變化

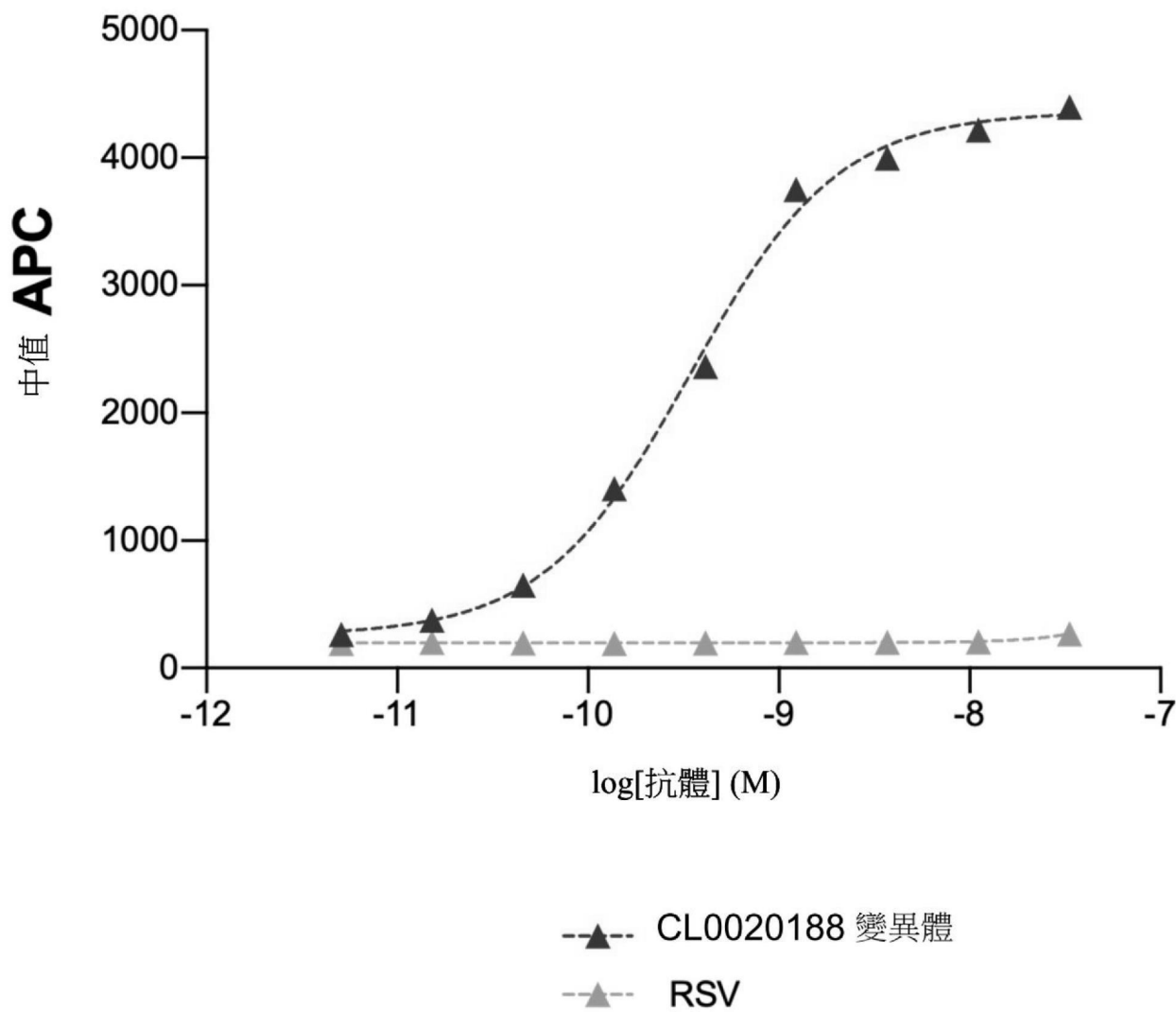


【圖 10A】

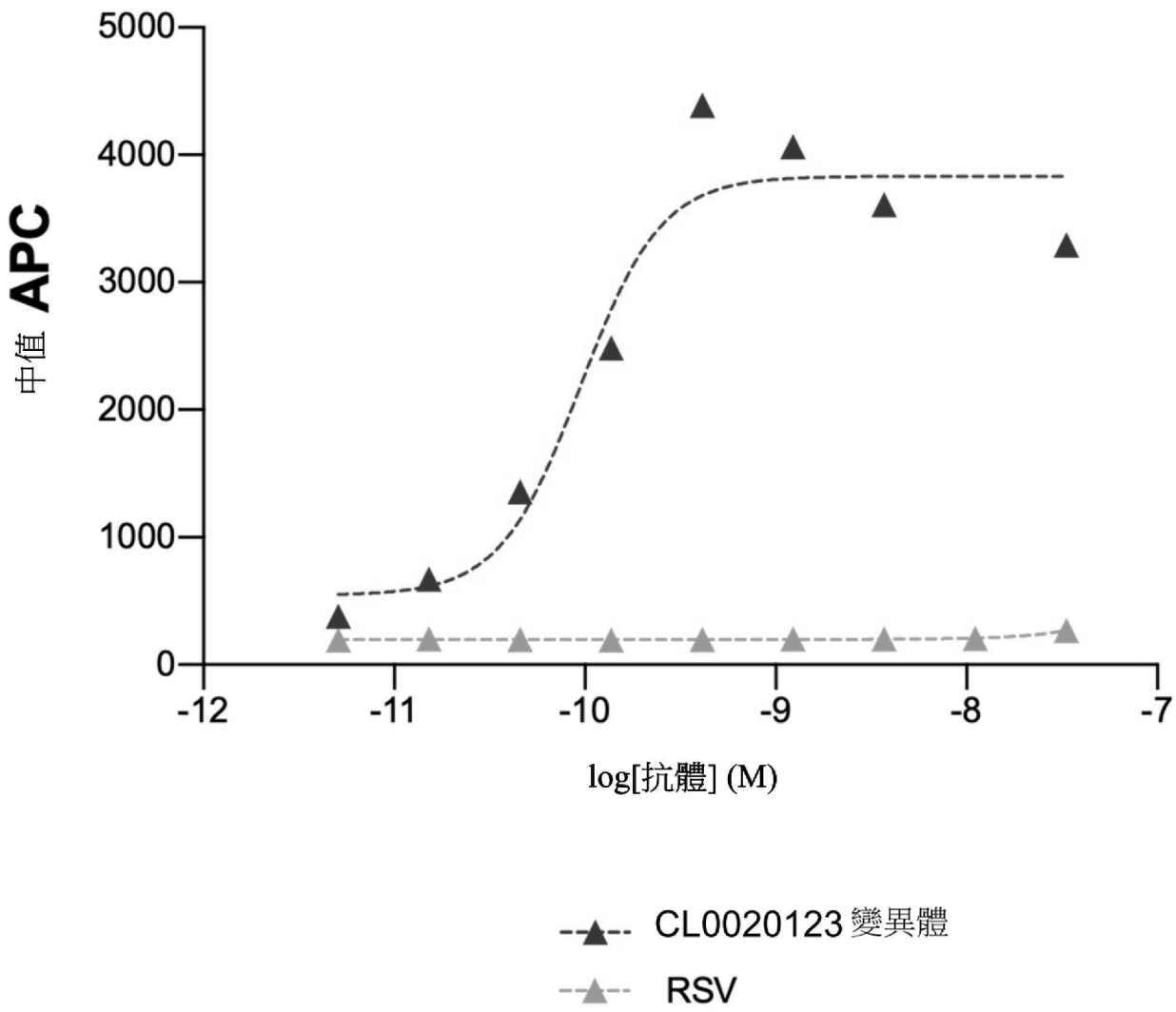
hTREM2敲入小鼠血漿中之經結合sTREM2



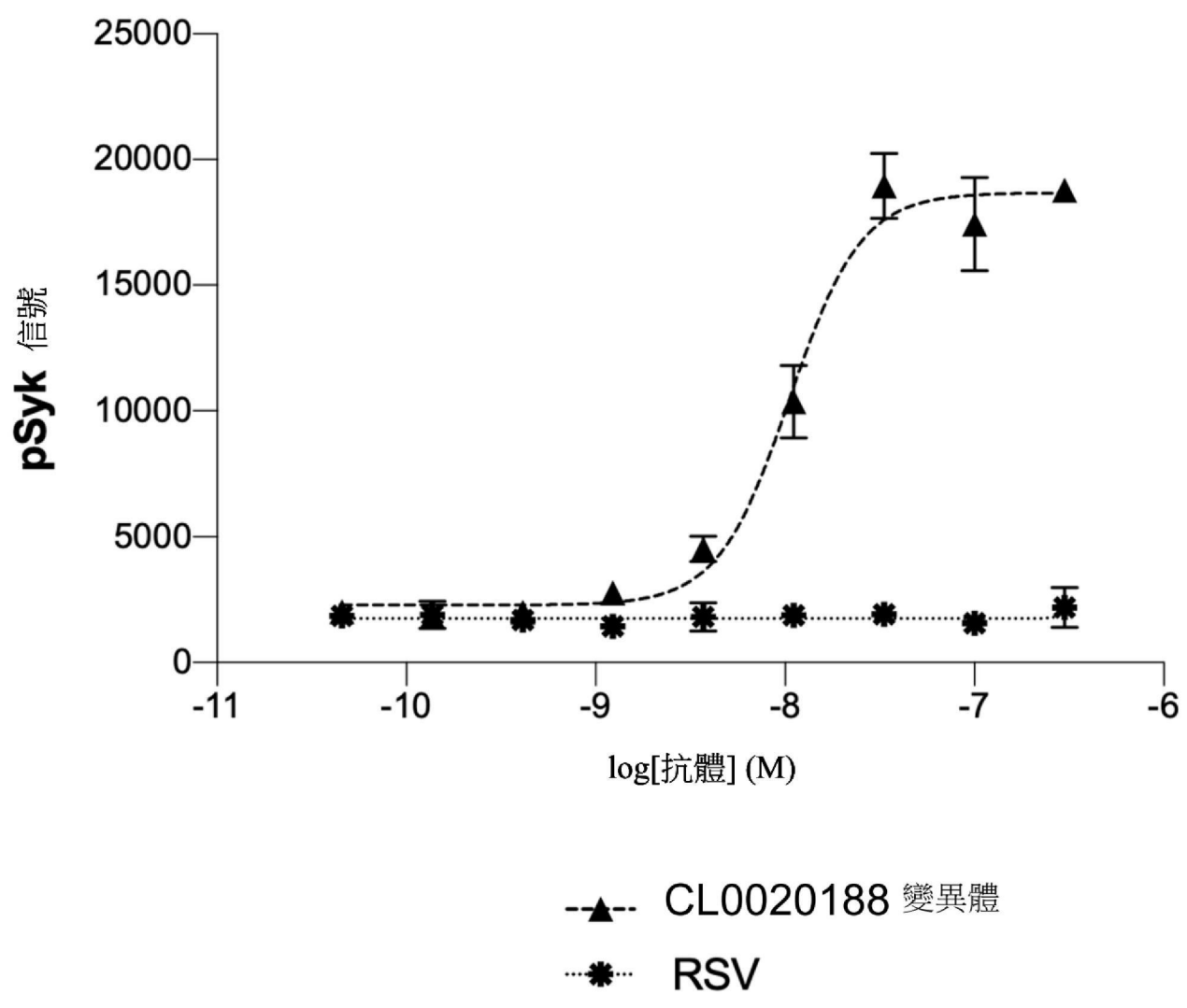
【圖 10B】



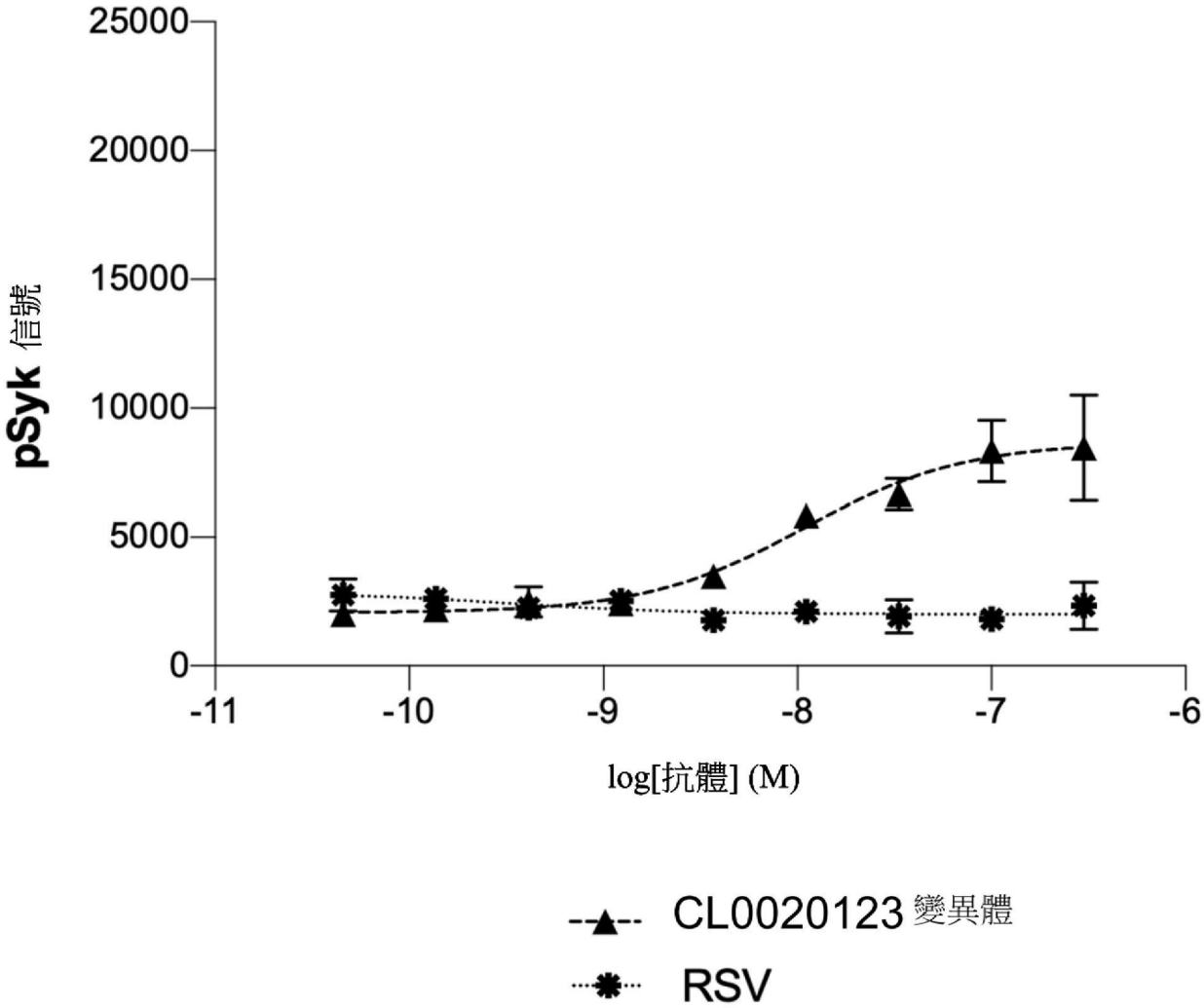
【圖 11A】



【圖 11B】

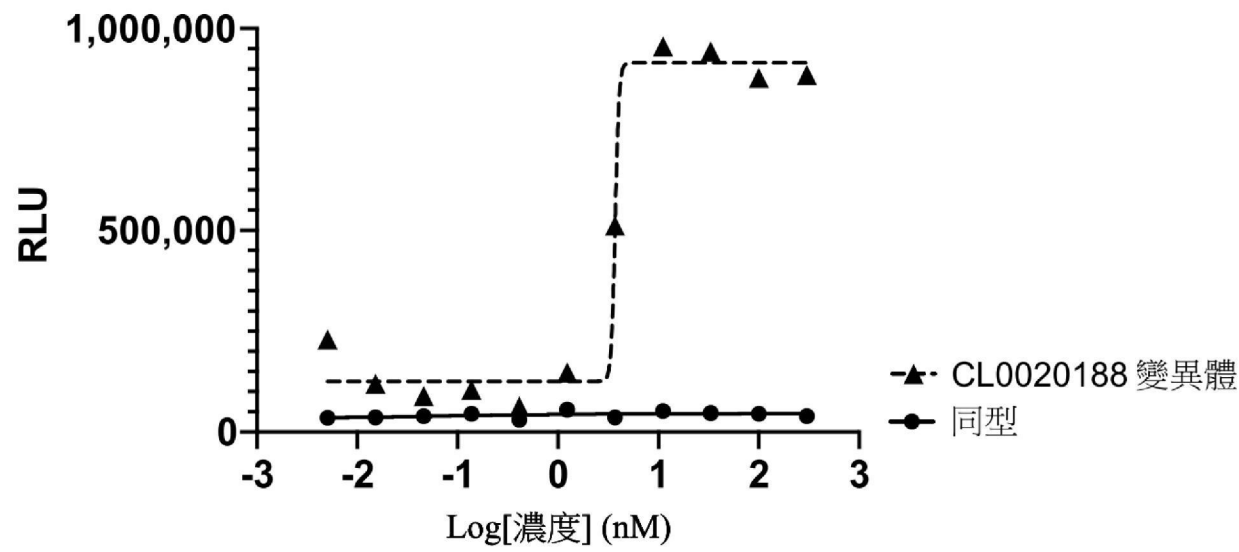


【圖 12A】

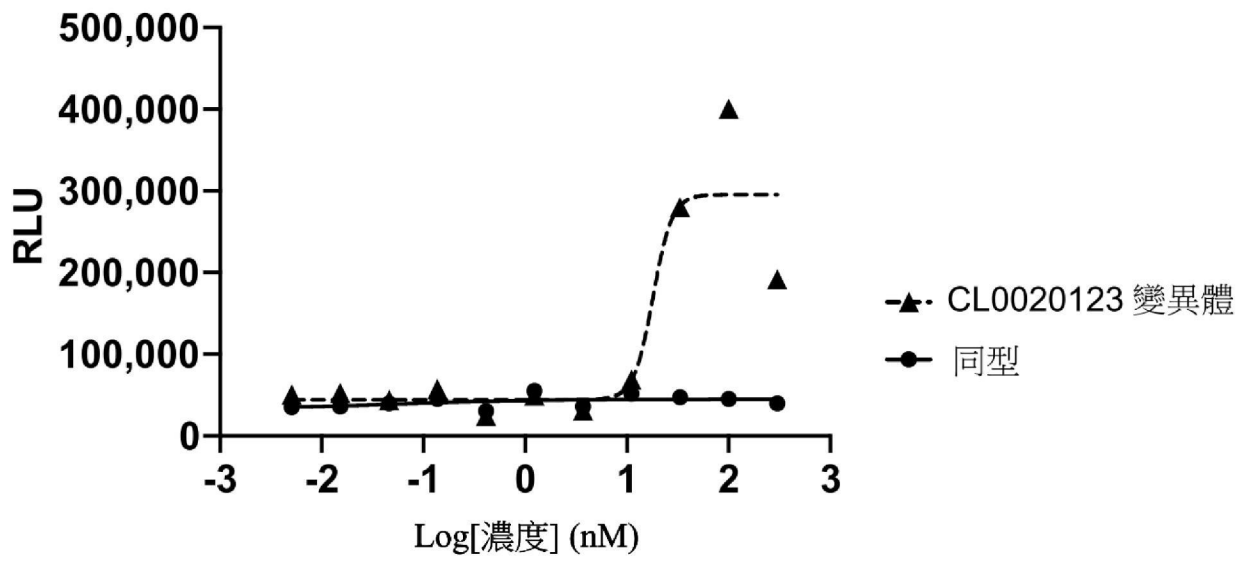


【圖 12B】

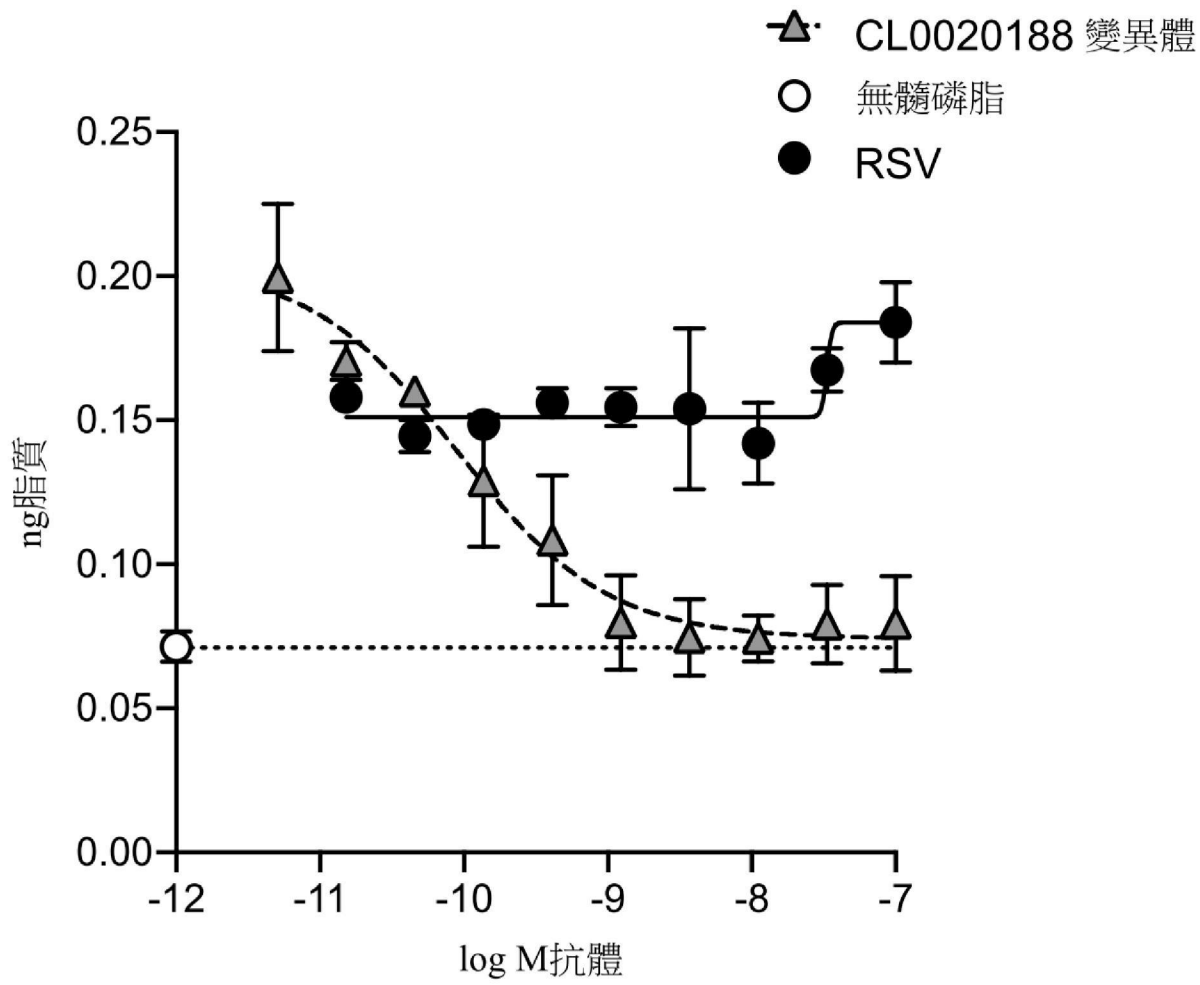
CL0020188 變異體



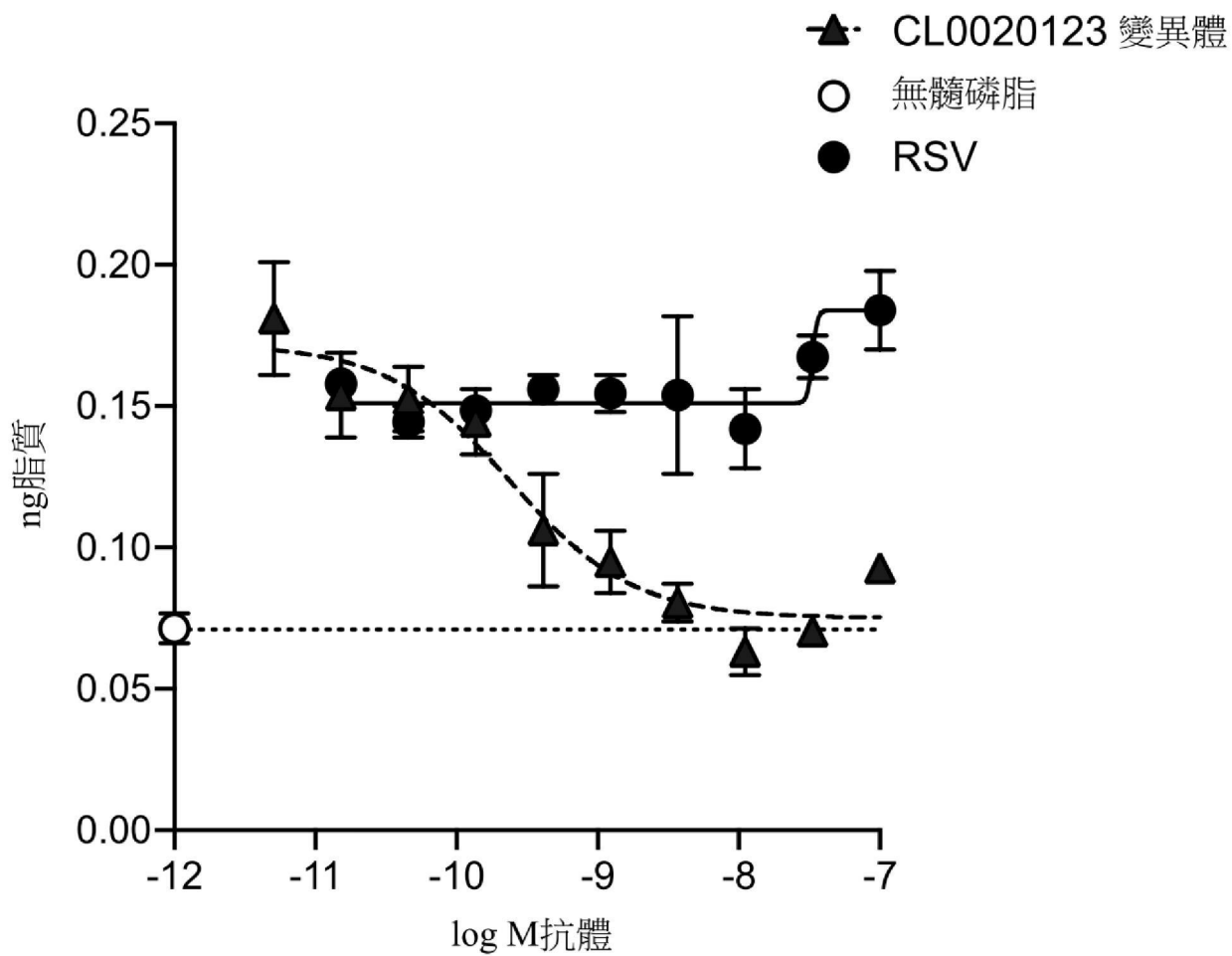
CL0020123 變異體



【圖 13】



【圖 14A】



【圖 14B】