

ANTICUERPOS TREM2 Y USOS DE ESTOS

La presente invención pertenece al campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a TREM2, composiciones que comprenden tales anticuerpos TREM2 y métodos para usar tales anticuerpos TREM2 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer.

Los receptores desencadenantes expresados en células mieloides 2 (TREM2) son una glicoproteína transmembranaria de la superficie celular que se expresa en células mieloides, tales como células dendríticas, granulocitos y macrófagos específicos de tejido, tales como osteoclastos, células de Kupffer y macrófagos alveolares. La región transmembranaria de TREM2 se asocia con las proteínas adaptadoras DAP12 y DAP10, y la señalización de TREM2 a través de las proteínas adaptadoras da como resultado la activación de dianas sucesivas tales como mTOR y MAPK. Por lo tanto, la activación de TREM2 da como resultado actividades tales como un aumento de proliferación, supervivencia, fagocitosis, estallido oxidativo fagocítica con producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Después de la activación de las células mieloides en determinadas circunstancias, las proteasas pueden escindir el TREM2 unido a la membrana, lo que da como resultado la liberación de TREM2 soluble.

El TREM2 ha sido involucrado en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. El TREM2 se expresa por la microglía en el cerebro, y se ha observado un aumento de expresión de TREM2 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y en modelos de ratón con patología tau. Además, las mutaciones de TREM2 están asociadas con enfermedades neurodegenerativas y se ha mostrado que los ratones con genes inactivados para TREM2 están protegidos contra los cambios inflamatorios seniles, la acumulación de lípidos oxidados y la pérdida de estructuras neuronales (ver, por ejemplo, Gerlach, et al., TREM2 triggers microglial density and age-related neuronal loss. *Glia*, 67(3):539-550 (2019)). La deficiencia de TREM2 también puede ser neuroprotectora para reducir la pérdida de volumen del hipocampo después de un traumatismo craneoencefálico (ver, Saber, et al., Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Deficiency Alters Acute Macrophage Distribution and Improves Recovery after Traumatic Brain Injury, *J. Neurotrauma*, 34:423-435 (2017)).

Los anticuerpos TREM2 son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT número WO 2016/023019 y la publicación PCT número WO 2019/028292 describen anticuerpos TREM2. Tales anticuerpos pueden agruparse y activar TREM2 *in vivo* y/o unirse a TREM2 humano con afinidad nanomolar.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad de anticuerpos TREM2 alternativos que 1) se unan a TREM2 humano con una alta afinidad deseable y tasas de asociación y disociación para una actividad óptima, 2) reduzcan el estado de activación de la microglía y/o promuevan la homeostasis de la microglía sin afectar los números totales de microglía (por ejemplo, sin impacto en la supervivencia), 3) inhiban la señalización de TREM2, 4) logren eficacia *in vivo*, 5) demuestren un bajo potencial inmunogénico y/o 6) demuestren características adecuadas de desarrollo tales como estabilidad, solubilidad, baja autoasociación y características farmacocinéticas que son aceptables para el desarrollo y/o uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos anticuerpos TREM2 que se unen a TREM2 humano con alta afinidad. Se considera que los anticuerpos de la presente invención proporcionan un medio para promover la homeostasis de la microglía. Los anticuerpos de la presente invención también tienen al menos una de las siguientes propiedades de reducir el estado de activación de la microglía y/o restaurar la homeostasis de la microglía, sin afectar los números totales de microglía (por ejemplo, sin afectar la supervivencia), lo que previene la fagocitosis de macrófagos, inhibe la señalización de TREM2, logra eficacia *in vivo*, demuestra un bajo potencial inmunogénico y/o demuestra características de capacidad de desarrollo adecuadas para el desarrollo clínico y/o uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Tales anticuerpos pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, y pueden tener eficacia terapéutica en dosis más bajas o con dosis menos frecuentes.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TREM2, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y la HCVR comprende CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, y en donde LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 1, LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 2, LCDR3 tiene una secuencia de

aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 3, HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 4, HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 5 y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 6. En una modalidad, la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 7, y la HCVR tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 8. En una modalidad, el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en donde la LC tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9, y la HC tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una HC de anticuerpos, en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10. En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una LC de anticuerpos, en donde la LC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9. En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una HC y una LC, en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9. En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una HC de anticuerpos, en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10, y una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una LC de anticuerpos, en donde la LC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9. En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una HC y LC, en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10, y la LC comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad, la presente invención proporciona la composición farmacéutica para usar

en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal. En una modalidad, la presente invención proporciona la composición farmacéutica para usar en el tratamiento de traumatismos craneoencefálicos.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar a un paciente que tiene un traumatismo craneoencefálico que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención.

En una modalidad, la presente invención también proporciona un anticuerpo de la presente invención para usar en un tratamiento. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para usar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para usar en el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico.

En una modalidad, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal. En una modalidad, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico.

Un "anticuerpo TREM2" se refiere a un anticuerpo que se une a TREM2 (incluidas las variantes de TREM2, tal como la variante R47H) y, cuando se administra *in vitro* o *in vivo*, da como resultado al menos una actividad deseada, tal como una reducción de la microglía activada.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, con respecto a la presente invención, se refiere a un complejo polipeptídico genomanipulado, no natural,

que tiene dos HC y dos LC, de modo que las cadenas pesadas y las cadenas ligeras están interconectadas por puentes disulfuro, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG. Cada cadena pesada está compuesta por una HCVR aminoterminal y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una LCVR aminoterminal y una región constante de cadena ligera. Cuando se expresan en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos se glicosilan en la región Fc. Típicamente, la glucosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Por lo general, los N-glicanos se fijan a asparagina. Los anticuerpos también pueden estar glucosilados en otras posiciones.

La región constante de las cadenas pesadas contiene dominios CH1, CH2 y CH3. CH1 viene después de la HCVR; el CH1 y la HCVR forman la porción de la cadena pesada de un fragmento de unión al antígeno (Fab), que es la parte de un anticuerpo que se une a los antígenos. CH2 viene después de la región bisagra y antes de CH3. CH3 viene después de CH2 y está en el extremo carboxiterminal de la cadena pesada. La región constante de las cadenas ligeras contiene un dominio, CL. CL viene después de la LCVR; la CL y la LCVR forman la porción de cadena ligera de un Fab.

Las regiones HCVR y LCVR del anticuerpo de la presente invención también pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones más conservadas, llamadas regiones marco ("FR"). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En la presente, las tres CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3", y las tres CDR de la cadena ligera se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La definición de CDR de Kabat (Kabat, *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación del NIH núm. 91-3242 (1991)) se basa en la variabilidad de secuencias de anticuerpos. La definición de CDR de Chothia (Chothia, *et al.*, "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani *et al.*, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) se basa en estructuras tridimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. Las definiciones de CDR de Chothia

son idénticas a las definiciones de CDR de Kabat con la excepción de HCDR1 y HCDR2. La definición de CDR de North (North, et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) se basa en el agrupamiento de propagación por afinidad con un gran número de estructuras cristalinas. Para los fines de la presente invención, la asignación de aminoácidos a los dominios de CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de los anticuerpos de la presente invención se basa en la conocida convención de numeración de Kabat.

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanizados o humanos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos. En el contexto de anticuerpos monoclonales, los términos "humano" (o "completamente humano") y "humanizado" son bien conocidos por los expertos en la técnica (Weiner, L.J., J. Immunother. 2006; 29: 1-9; Mallbris L, et al., J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13-15). Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos IgG4PAA. Un anticuerpo IgG4PAA es un anticuerpo IgG4 que tiene una sustitución de serina por prolina y dos sustituciones de leucina por alanina en las posiciones (según la numeración de la UE) 228, 234, 235, respectivamente (es decir, S228P, F234A, L235A).

Una molécula de ADN de la presente invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos no natural que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los polipéptidos en un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera, cadena pesada variable o cadena ligera variable).

Un ADN aislado que codifica una región HCVR se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa al ligar operativamente el ADN que codifica HCVR a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana, así como también de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse, por ejemplo, mediante amplificación por PCR estándar.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa al ligar operativamente el ADN que codifica LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana, así como de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región

constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. Preferentemente, para los anticuerpos de la presente invención, la región constante de cadena ligera es una región constante kappa.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden expresarse en una célula hospedadora después de que las secuencias se hayan ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión. Por lo general, los vectores de expresión son replicables en los organismos hospedadores ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse fácilmente en células de mamíferos, cuyos ejemplos no limitativos incluyen células CHO, NS0, HEK293 o COS. Las células hospedadoras se cultivan mediante técnicas conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del anticuerpo y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos conocidos, que varían según el tipo de hospedador celular.

Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas para purificar proteínas, que incluyen, entre otros, anticuerpos, y tales métodos son conocidos en la técnica.

Un anticuerpo de la presente invención, o una composición farmacéutica que lo comprende, puede administrarse por vías parenterales, cuyos ejemplos no limitativos son la administración subcutánea y la administración intravenosa. Un anticuerpo de la presente invención puede administrarse a un paciente con portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22^{da} edición (2012), A. Loyd, A., et al., Pharmaceutical Press) y comprenden un anticuerpo, como se describe en la presente, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "que trata" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a ralentizar, interrumpir, detener, aliviar, paralizar, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente.

"Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un anticuerpo TREM2 de la presente invención o composición farmacéutica que comprende tal anticuerpo que provocará la respuesta médica o biológica de un tejido, sistema, animal, mamífero o humano o el efecto terapéutico deseado sobre estos que busca el investigador, médico u otro profesional de la salud. Una cantidad eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el cuadro clínico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Tal beneficio incluye, entre otros, la reducción de la activación de la microglía y el potencial para retardar la atrofia cerebral o la pérdida cognitiva. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados que se obtienen en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente, el médico que diagnostica considera una serie de factores que incluyen, entre otros: el tamaño, la edad y la salud general del paciente, la enfermedad o trastorno específico involucrado, el grado o la participación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno, la respuesta del paciente concreto, el compuesto particular que se administra, el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la preparación que se administra, la pauta de administración seleccionada, el uso de medicación concomitante y otras circunstancias relevantes.

Genomanipulación de anticuerpos

Para generar los anticuerpos de la presente invención se llevó a cabo una genomanipulación significativa, que incluye la línea germinal de anticuerpos, la maduración de la afinidad, la desinmunización y la optimización de la farmacosimilitud. Tales anticuerpos son anticuerpos humanos que tienen alta afinidad por TREM2 humano, inmunogenicidad reducida y desarrollabilidad aceptable u óptima para estudios clínicos en humanos.

Por ejemplo, se llevó a cabo genomanipulación en el motivo DSD de cadena pesada (residuos D54, S55 y D56) para reducir la isomerización en D54 y/o D56. La serina en la posición 55 se mutó en glutamina (S55Q) o histidina (S55H). Ambas mutaciones son neutrales en la afinidad de anticuerpos. Inesperadamente, la mutación de S55Q dio como resultado una reducción significativa de la isomerización del 5,1 % al 1 %, mientras que la mutación de S55H aumentó la isomerización al 63 %. Por lo tanto, la mutación de la cadena pesada S55Q reduce la isomerización mientras mantiene la afinidad de unión.

EJEMPLOS

Ejemplo: Expresión y purificación de anticuerpos

Los anticuerpos TREM2 de la presente invención pueden expresarse y purificarse esencialmente como se explica a continuación. Una célula hospedadora adecuada, tal como HEK 293 o CHO, se puede transfectar de forma transitoria o estable con un sistema de expresión para segregar anticuerpos mediante el uso de una relación de vector HC:LC predeterminada óptima (tal como 1:3 o 1:2) o un sistema de vector único que codifica tanto la HC como la LC. Los medios clarificados, en los que se ha secretado el anticuerpo, pueden purificarse con cualquiera de las varias técnicas de uso común. Por ejemplo, el medio se puede aplicar a una columna MabSelect® (GE Healthcare) o una columna KappaSelect (GE Healthcare) para el fragmento Fab, que se ha equilibrado con un amortiguador compatible, tal como una solución salina amortiguada con fosfato (pH 7,4). La columna se puede lavar para eliminar los componentes de unión no específicos.

El anticuerpo unido puede eluirse, por ejemplo, mediante un gradiente de pH (tal como 20 mM de amortiguador Tris, pH 7,0, a 10 mM de amortiguador de citrato de sodio, pH 3,0, o solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4, a 100 mM de amortiguador de glicina, pH 3,0). Se pueden detectar fracciones de anticuerpos, tales como por SDS-PAGE, y luego se pueden agrupar. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo puede concentrarse y/o esterilizarse por filtración mediante el uso de técnicas comunes. El agregado soluble y los multímeros pueden eliminarse de forma eficaz mediante técnicas comunes, que incluyen exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, intercambio iónico, multimodal, o cromatografía con hidroxiapatita. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía está entre alrededor del 95 % y alrededor del 99 %.

El producto puede mantenerse refrigerado, congelarse inmediatamente a -70 °C o puede liofilizarse. Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO para los anticuerpos humanos de ejemplo de la presente invención se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos del Anticuerpo TREM2 1.

LCDR1		LCDR2		LCDR3		HCDR1		HCDR2		HCDR3	
SEQ	ID	SEQ	ID	SEQ	ID	SEQ	ID	SEQ	ID	SEQ	ID
NO: 1		NO: 2		NO: 3		NO: 4		NO: 5		NO: 6	

LCVR		HCVR		LC		HC	
SEQ	ID NO: 7	SEQ	ID NO: 8	SEQ	ID NO: 9	SEQ	ID NO: 10

Ejemplo: Cinética de unión del Anticuerpo 1 y afinidades por TREM2

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) a 37 °C se utiliza para determinar la cinética de unión y afinidades de los anticuerpos TREM2 Anticuerpo 1, Anticuerpo de referencia A o Anticuerpo de referencia B por el antígeno. El Anticuerpo de referencia A comprende una HCVR proporcionada por SEQ ID NO: 11, 13, 15, 16, 132, 135, 126 y una LCVR proporcionada por SEQ ID NO: 20, 22, 23, 25, 144, 131 y 129 en la publicación PCT número WO2019/028292. El Anticuerpo de referencia B comprende una HCVR y una LCVR como se proporciona en SEQ ID NO: 412 y 413, respectivamente, en la publicación PCT número WO2016/023019.

La cinética de unión y la afinidad de anticuerpos TREM2 por dominios extracelulares (ECD) de TREM2 humanos (SEQ ID NO: 11), de ratón (SEQ ID NO: 12), de rata (SEQ ID NO: 14), de conejo (SEQ ID NO: 13) o de mono cangrejero (SEQ ID NO: 15) fusionados a un marcador His carboxiterminal se determinan mediante un biosensor de resonancia de plasmones superficiales tal como BIAcore® T100, BIAcore® T200 o BIAcore® 8K (GE Healthcare, Piscataway, N.J.).

Las muestras se disuelven en 1xHBS - EP+amortiguador de migración (Teknova), y se utiliza un chip sensor CM5 Serie S acoplado a proteína A (GE Healthcare) para capturar el anticuerpo. La unión se evalúa mediante el uso de múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realiza a 37 °C a un caudal de 50 µl/min para la captura de anticuerpos y 30 µl/min para la asociación y disociación de ligandos. Cada ciclo consiste en lo siguiente: inyección de 7 µl de 1 µg/ml de anticuerpo con el objetivo de capturar 150-250 unidades de respuesta, inyección de ECD de TREM2-His humanos, de macaco cangrejero, de conejo, de rata o de ratón (a partir de 20 nM y mediante el uso de diluciones en serie dobles para cada ciclo) seguido de 200

segundos para la asociación, seguida de una fase de disociación de 800 segundos y regeneración mediante el uso de 10 mM de clorhidrato de glicina, pH 1,5, durante un tiempo de contacto de 30 segundos. Las velocidades de asociación (es decir, k_{on}) y disociación (es decir, k_{off}) para cada ciclo se evalúan mediante doble referencia estándar y se ajustan al modelo de "unión 1:1 (Langmuir)" en la evaluación de Biacore 8K en modo por lotes de cinética paralela. La afinidad (K_D) se calculó a partir de la cinética de unión de acuerdo con la relación $K_D = K_{off}/K_{on}$. Debido a los datos de unión bifásica para el Anticuerpo de referencia A, se utilizó un modelo de unión 2:1 de ligando heterogéneo encontrado en la evaluación de Biacore 8K para calcular la K_D . El ligando heterogéneo 2:1 informa valores de 2 k_{on} y 2 k_{off} para calcular el valor de K_D . N=3 para el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo de referencia A, y n=1 para el Anticuerpo de referencia B.

En experimentos realizados esencialmente como se describe anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 2. Cinética de unión y afinidad (media $\pm$ desviación estándar).

TREM2 humano	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
Anticuerpo 1	$3,4 \pm 0,1 \times 10^6$	$5,8 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$0,17 \pm 0,01$
Anticuerpo de referencia B	$4,9 \pm 0,5 \times 10^5$	$5,2 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$9,8 \pm 0,1$
Anticuerpo de referencia A*	$7,0 \times 10^6$ $2,1 \times 10^3$	0,12 $5,9 \times 10^{-4}$	3,69
TREM2 de macaco cangrejero	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
Anticuerpo 1	$5,0 \times 10^6$	$3,7 \times 10^{-4}$	0,075
Anticuerpo de referencia B	No evaluado	No evaluado	No evaluado
Anticuerpo de referencia A*	$1,1 \times 10^7$ $3,1 \times 10^3$	0,078 $6,5 \times 10^{-4}$	1,2
TREM2 de ratón	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D (nM)
Anticuerpo 1	$2,5 \pm 0,1 \times 10^7$	$4,4 \pm 0,5 \times 10^{-2}$	$1,6 \pm 0,2$
Anticuerpo de referencia B	$1,3 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,9 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$2,1 \pm 0,1$

Anticuerpo de referencia A	ND [#]	ND [#]	ND [#]
R47H de TREM2 humano	k_{on}(M⁻¹s⁻¹)	k_{off}(s⁻¹)	K_D (nM)
Anticuerpo 1	5,0 x10 ⁶	3,7 x10 ⁻⁴	0,075
TREM2 de rata	k_{on}(M⁻¹s⁻¹)	k_{off}(s⁻¹)	K_D (nM)
Anticuerpo 1	ND [#]	ND [#]	ND [#]
Anticuerpo de referencia B	2,8±0,2 x10 ⁶	2,1±0,1 x10 ⁻³	0,73±0,03
Anticuerpo de referencia A	ND [#]	ND [#]	ND [#]

*La unión es bifásica y los datos se ajustan al modelo de unión de ligando heterogéneo que da como resultado dos velocidades de asociación (k_{on}) y dos velocidades de disociación (k_{off}).

[#]No se detectó unión por encima del fondo a 200 nM de TREM2

Estos datos demuestran que el Anticuerpo 1 se unió a TREM2 humano y TREM2 de macaco cangrejero con alta afinidad (pM). El Anticuerpo 1 también se unió a TREM2 de ratón con afinidad nM y no se unió a TREM2 de rata. El Anticuerpo 1 se unió a TREM2 humano con mayor afinidad en comparación con el Anticuerpo de referencia A y el Anticuerpo de referencia B, y el Anticuerpo 1 también se unió a TREM2 de macaco cangrejero con mayor afinidad en comparación con el Anticuerpo de referencia A. No se detectó unión con TREM2 de conejo para ninguno de los anticuerpos evaluados.

Se realizaron experimentos similares a 25 °C y se obtuvieron los siguientes datos. El Anticuerpo 1 se unió al TREM humano, de ratón y de mono cangrejero y al mutante de TREM de R47H humano, con afinidades de unión de 150 pM, 3,9 nM, 43 pM y 290 pM, respectivamente. El mutante de R47H se ha asociado con la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Estos datos demuestran que el Anticuerpo 1 es capaz de unirse a TREM de R47H.

Ejemplo: Unión del Anticuerpo 1 a células que expresan TREM2

Para investigar si el Anticuerpo 1 se une a las células que expresan TREM2, se realiza un experimento de unión. La estirpe celular BW5147.G.1.4 se transduce para

expresar TREM2 humano y su proteína adaptadora DNAX adaptadora 12 (DAP12). Para evaluar la unión, se incuban 500 000 células en presencia del Anticuerpo 1 con una titulación triple de 12 puntos a partir de 30 µg/ml durante 30 minutos a 37 °C. La unión del anticuerpo se detecta mediante el uso de Alexa Fluor 647 caprina contra IgG humanas (Jackson Labs). La intensidad de fluorescencia media (MFI) se mide mediante el uso de un citómetro de flujo Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, el Anticuerpo 1 se unió a células BW5147.G.1.4 que expresan TREM2 con una EC₅₀ de 0,08 µg/ml. Estos datos demostraron que el Anticuerpo 1 se une a TREM2 unido a la membrana celular.

Ejemplo: Inhibición de la señalización de TREM2

Para investigar el impacto de la activación de NFAT mediada por anticuerpos TREM2 en presencia de ligando, se utiliza fosfatidilserina (PS, lípidos Avanti) como ligando de TREM2. Una placa de 96 pocillos que contiene 1,5 mM de PS por pocillo se seca a temperatura ambiente durante tres horas. Las células indicadoras BW5147.G.14 de luciferasa de NFAT de TREM2 (400 000 células por pocillo) se sembraron en placas recubiertas con PS en presencia de un anticuerpo de control de isotipo o el Anticuerpo 1, con una titulación de 8 puntos 5 veces a partir de 30 µg/ml. Después de una incubación de 18 horas a 37 °C, se detecta la luminiscencia mediante el uso del kit de ensayo rápido de luciferasa Pierce Firefly (Thermo Fisher) y el lector de placas Envision 2105 (Perkin Elmer).

En un experimento realizado esencialmente como se describe anteriormente, el Anticuerpo 1 inhibió la activación de NFAT mediada por PS de una manera dependiente de la concentración con una IC₅₀ de 0,40 µg/ml. El anticuerpo de control no inhibió la activación de NFAT mediada por PS. Estos datos demuestran que el Anticuerpo 1 puede inhibir la señalización de TREM2 desencadenada por ligando.

Ejemplo: Inhibición de la activación de TREM2 en macrófagos

Para investigar el impacto del Anticuerpo 1 en la activación de TREM2 en macrófagos, los macrófagos se cultivan encima de corte histológico cerebral PDAPP (que contiene ligandos endógenos fisiológicos de TREM2) en presencia o ausencia del Anticuerpo 1 o del anticuerpo de control de isotipo.

Los macrófagos derivados de la médula ósea se generan mediante el cultivo de células de la médula ósea durante 5 días en presencia de 50 ng/ml de CSF-1 (PEPROTECH). Para inducir la activación de TREM2, se sembraron 400 000 macrófagos en corte histológico cerebral de ratones transgénicos precursores amiloides PDAPP durante tres días en presencia de 3 µg/ml o 12 µg/ml de anticuerpo de control o Anticuerpo 1. Las concentraciones de osteopontina, un producto directo de la activación de TREM2, se miden en el sobrenadante mediante un kit ELISA (R&D Systems).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 3. Concentraciones de osteopontina de macrófagos (pg/ml) en presencia o ausencia del Anticuerpo 1.

	Macrófago	Macrófago + cerebro PDAPP	cerebro PDAPP
Sin anticuerpos (control)	38652±2033	127475±4863	7±3

	Macrófago + cerebro PDAPP	
	3 µg/ml de anticuerpos	12 µg/ml de anticuerpos
Anticuerpo de control	125141±30602	109078±37666
Anticuerpo 1	57803±5706	38834±16348

Estos datos demuestran que 3 µg/ml y 12 µg/ml del Anticuerpo 1 inhibían la producción de osteopontina. Estos resultados indican que el Anticuerpo 1 inhibe la activación de TREM2 en respuesta a ligandos fisiológicos.

Ejemplo: Impacto del Anticuerpo 1 en el estado de activación de la microglía durante la neurodegeneración mediada por tau *in vivo*

Para evaluar el impacto del Anticuerpo 1 en el estado de activación de la microglía durante la neurodegeneración *in vivo* mediada por tau, el Anticuerpo 1 se

administra a ratones transgénicos tau rTg4510 P301L hembra de siete meses de edad los días cero, con una titulación de 6 puntos 3 veces a partir de 300 mg por gramo de peso corporal. El día siete, se sacrifican los ratones y se recoge tejido cerebral para los análisis de ARN. *Clec7a*, un gen dependiente de TREM2, se mide en el hipocampo mediante un ensayo de qPCR de TaqMan, y la expresión relativa se normaliza al gen de mantenimiento *Hprt*.

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 4. Expresión relativa de *Clec7a* después del tratamiento con el Anticuerpo 1 (+/- SEM)

Anticuerpo 1 (mg/kg)	300	100	30	10	3	1
Expresión relativa de <i>Clec7a</i>	9,9± 1,0	13,4± 4,0	13,8± 1,0	19.± 2,0	16± 2,0	18± 1,0

Estos datos demuestran una reducción dependiente de la concentración de anticuerpos de la concentración de *Clec7a* en el hipocampo después del tratamiento con el Anticuerpo 1 e indican que el Anticuerpo 1 inhibe TREM2 *in vivo*. También se determinaron las concentraciones de TREM2 soluble y se observó un aumento dependiente de la dosis de TREM2 soluble en el CSF.

Ejemplo: Proteómica peptídica asociada al complejo principal de histocompatibilidad

Para investigar el potencial inmunogénico del Anticuerpo 1, se realiza un ensayo de proteómica peptídica asociada al complejo principal de histocompatibilidad (MAPP). Se preparan células dendríticas humanas primarias de diez donantes humanos normales a partir de capas leucoplaquetarias mediante el aislamiento de células CD14 positivas con perlas anti-CD14 y un separador magnético. Las células CD14 positivas se sembraron en una placa a 5°6 células por pocillo y se diferenciaron en células dendríticas inmaduras mediante incubación con 20 ng/ml de IL-4 y 40 ng/ml de GM-CSF en medio RPMI completo que contenía suero bovino fetal al 10 % durante 3 días a 37 °C y CO₂ al 5 %. Cuatro días después (día cuatro), se cambia el medio y se añade medio recién preparado que contiene 3 µM de anticuerpo a las células. El día cinco, se añaden 5 µg/ml de LPS para transformar las células en células

dendríticas maduras. El sexto día, las células se lisan en 1 mL de amortiguador RIPA con inhibidores de proteasa y el lisado se congela a -80 °C.

Las muestras se preparan para el aislamiento de MHC-II al descongelar el lisado congelado y homogeneizarlo durante 5-10 segundos. Los lisados homogeneizados se clarifican por centrifugación. La inmunoprecipitación de los complejos MHC-II se realiza mediante el uso de anticuerpo anti-MHC-II biotinilado acoplado a perlas de estreptavidina. El complejo unido se eluye con ácido acético al 5 %, TFA al 0,1 %. Los péptidos MHC-II se separan de las proteínas receptoras coeluyentes al hacer pasar el eluato sobre un filtro MWCO 10k prelavado. Los péptidos MHC-II aislados se analizan mediante nano LC/MS mediante el uso de un espectrómetro de masas Thermo QE-HFX. Las identificaciones de péptidos se generan mediante una canalización proteómica mediante el uso de algoritmos de búsqueda sin enzimas y una base de datos bovina/humana con secuencias de anticuerpos de prueba adjuntas para determinar el porcentaje de donantes que muestran péptidos MHC-II de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo evaluado.

Al seguir los procedimientos esencialmente como se describió anteriormente, el Anticuerpo 1 demostró un bajo riesgo de inmunogenicidad, como lo mostró el 0 % de donantes que mostraron grupos no germinales en la cadena pesada CDR3.

SECUENCIAS

LCDR1 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 1)

RASQAIRDDLG

LCDR2 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 2)

YAASSLQS

LCDR3 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 3)

LQNYNYPHT

HCDR1 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 4)

GFSFNTYWIG

HCDR2 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 5)

IIYPGDQDIRYSPSFQG

HCDR3 del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 6)

ARYGRYIYGYYGGYHGMDV

LCVR del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIRDDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQNYNYPHTFGQGGTKLEIK

HCVR del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 8)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFSFNTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDQ
DIRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYGRYIYGYYGGYHGMD
VWGQGTTVTVSS

LC del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIRDDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQNYNYPHTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HC del Anticuerpo 1 (SEQ ID NO: 10)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFSFNTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDQ
DIRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYGRYIYGGYHGMD
VWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

TREM2-His de ECD humano (SEQ ID NO: 11)

HNTTVFQGVAGQSLQVSCPYSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLL
SFLRRWNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSEADTLRKVLVEVLA
DPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVEHSISRSLLEGEIPFPPTSHHHHHH

TREM2-His de ECD de ratón (SEQ ID NO: 12)

LNTTVLQGMAGQSLRVSCTYDALKHWGRRKAWCRQLGEEGPCQRVVSTHGVWLLA
FLKKRNGSTVIADDTLAGTVTITLKNLQAGDAGLYQCQSLRGREAELQKVLVEVLED
PLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTSRNQETSFPTSHHHHHH

TREM2-HIS de ECD de conejo (SEQ ID NO: 13)

NTTVFQGVAGQSLRVSCPYSATHWGRRKAWCRQLGEEGPCERVVSTHSWWLLSF
LKRRNGSTAITDDALGGTLTVTLRDLQAQDAGVYQCQSLQGREASTLQKILVEVLTEP
LEHEHAGDFWVPEESGSFEDPPVERSSSRSPSEGEPSFPASPASGGGGQHSHHHHHH

TREM2-His de ECD de rata (SEQ ID NO: 14)

NTTVLQGVAGQSLRVSCTYDALRHWGRRKAWCRQLAEEGPCQRVVSTHGVWLLAF
LRKQNGSTVITDDTLAGTVTITLRNLQAGDAGLYQCQSLRGREAELQKVVVEVLEDP
LDDQDAGDLWVPEESESFEGAQVEHSTSRSQSGGGGGQHSHHHHHH

TREM2-His de ECD de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 15)

HNTTVFQGVAGQSLQVSCPYSMKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLL
SFLRRRNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGFYQCQSLHGSEADTLRKVLVEVLA

DPLDHRDAGDLWVPGESESFEDAHVEHSISRPSQGSCLPSCLKEGGGGQH HHHH
H

SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:

1. Un anticuerpo que se une a TREM2, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en donde la LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y la HCVR comprende CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, y en donde LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 1, LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 2, LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 3, HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 4, HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 5 y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 7, y la HCVR tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 8.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una LC y una HC, y en donde la LC tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 9, y la HC tiene una secuencia de aminoácidos proporcionada por SEQ ID NO: 10.
4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 para el uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
6. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 5, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal.
7. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4 para el uso en el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico.
8. Un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad neurodegenerativa o traumatismo craneoencefálico, que comprende

administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo de una cualquiera de la reivindicaciones 1-3.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el paciente tiene una enfermedad neurodegenerativa.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal.
11. El método de la reivindicación 8, en donde el paciente tiene un traumatismo craneoencefálico.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso en un tratamiento.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o traumatismo craneoencefálico.
14. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 13 para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
15. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 14, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS o demencia frontotemporal.
16. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 13 para el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico.
17. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o traumatismo craneoencefálico.
18. El uso de la reivindicación 17 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
19. El uso de la reivindicación 18, en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, parálisis cerebral progresiva, esclerosis múltiple, ALS, traumatismo craneoencefálico o demencia frontotemporal.
20. El uso de la reivindicación 17 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico.

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos TREM2 y usos de estos para tratar enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas.