

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790104 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.06.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.07.17

(54) САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ АНТИТЕЛ К TREM-1

(31) 14177547.8; 14194893.5

(32) 2014.07.17; 2014.11.26

(33) EP

(86) PCT/EP2015/066501

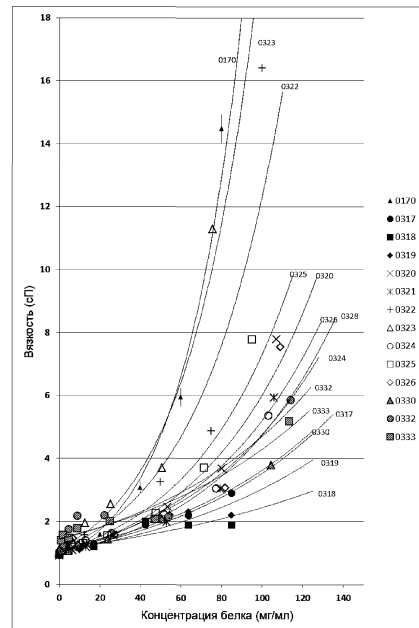
(87) WO 2016/009086 2016.01.21

(71) Заявитель:
НОВО НОРДИСК А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Хенриксен Анетте, Къяергаард
Кристиан, Вестфаль Штеннике
Вибекке, Виберг Шарлотта (DK)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(57) Описаны антитела, которые способны специфически связывать и предупреждать активацию TREM-1, белка, экспрессируемого на моноцитах, макрофагах и нейтрофилах, как с хорошей аффинностью, так и с низкой вязкостью в клинически релевантных концентрациях. Такие антитела находят применение в терапии субъектов с воспалительным заболеванием, таким как ревматоидный артрит и воспалительное заболевание кишечника.



201790104 A1

201790104 A1

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ АНТИТЕЛ К TREM-1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Данное изобретение относится к TREM-1 mAbs и к мутации специфических отрицательно заряженных и незаряженных аминокислот, участвующих либо во взаимодействии TREM-1 mAb с самими собой, либо во взаимодействии TREM-1 mAb с TREM-1, для снижения вязкости растворов mAb и сохранения целевой аффинности, изобретение также относится к применению таких антител для терапевтических и фармацевтических целей.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ

SEQ ID NO: 1 изображает аминокислотную последовательность дикого типа (wt) человеческого TREM-1.

SEQ ID NO: 2 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0170 из Международной заявки WO2013/120553).

SEQ ID NO: 3 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0170 из Международной заявки WO2013/120553).

SEQ ID NO: 4 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0317, E27Q, E97S).

SEQ ID NO: 5 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0318, E27Q, E97Q).

SEQ ID NO: 6 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0319, E97S).

SEQ ID NO: 7 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизованного TREM-1 антитела (mAb 0320, E97Q).

SEQ ID NO: 8 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0321, E27Q).

SEQ ID NO: 9 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0322, F32A).

SEQ ID NO: 10 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0323, F32S).

SEQ ID NO: 11 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0324, A59Y).

SEQ ID NO: 12 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0325, N57S).

SEQ ID NO: 13 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0326, A59Y, N57S).

SEQ ID NO: 14 изображает аминокислотную последовательность лёгкой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0330, F32A, E27Q, E97Q).

SEQ ID NO: 15 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0332, A59Y; 0332 представляет собой mAb, полученное в результате объединения SEQ ID NO: 15 в качестве HC и SEQ ID NO 5 в качестве LC, Таблица 1).

SEQ ID NO: 16 изображает аминокислотную последовательность тяжёлой цепи гуманизированного TREM-1 антитела (mAb 0333, A59Y; 0333 представляет собой mAb, полученное в результате объединения SEQ ID NO: 16 в качестве HC и SEQ ID NO 14 в качестве LC, Таблица 1).

SEQ ID NO: 17 изображает аминокислотную последовательность полноразмерного cTREM-1.

SEQ ID NO 18 изображает тяжёлую цепь Fab-фрагмента mAb 0170.

SEQ ID NO 19 изображает лёгкую цепь Fab-фрагмента mAb 0170.

СВЕДЕНИЯ О ПРЕДШЕСТВУЮЩЕМ УРОВНЕ ТЕХНИКИ

TREM-1 представляет собой активирующий рецептор, экспрессируемый на моноцитах, макрофагах и нейтрофилах. Эти клетки играют главную роль в хронических воспалительных заболеваниях вследствие высвобождения цитокинов и других медиаторов, которые опосредуют воспаление. Экспрессия мРНК и белка TREM-1 активируется у пациентов с RA и IBD, и TREM-1-позитивные клетки накапливаются в очагах воспаления, коррелируя с тяжестью заболевания. Пептидогликан-распознающий белок 1 (PGLYRP1), экспрессируемый главным образом активированными нейтрофилами, представляет собой лиганд для TREM-1 и опосредует TREM-1 передачу сигнала при связывании.

In vitro участие TREM-1 вызывает секрецию провоспалительных цитокинов, включая TNF, IL-8, и моноцитарного хемотаксического белка-1. Кроме того, TREM-1 передача сигнала суммируется с передачей сигналов со многих Toll-подобных рецепторов (TLR), что дополнительно усиливает провоспалительные сигналы. В свою очередь это активирует экспрессию TREM-1, в результате имеем порочный круг амплификации воспаления. Всё больше экспериментальных данных указывает на то, что TLRs способствуют развитию и прогрессированию хронических воспалительных заболеваний, таких как RA и IBD.

В Международной заявке WO 2013/120553 раскрываются гуманизированные mAbs к TREM-1, которые ингибируют функцию как TREM-1 человека, так и TREM-1 яванского макака. Однако профиль вязкости mAbs к TREM-1 может затруднить производственный процесс получения лекарственного препарата с концентрацией >50 мг/мл и может ограничить оптимальную дозу в клинических условиях. Высокая доза (несколько мг/кг) терапевтического белка часто необходима для достижения адекватного клинического эффекта, и поскольку подавляющее большинство этих терапевтических средств вводят подкожно, самостоятельное введение этого лекарственного средства ограничивается объёмами < 1.5 мл (Shire et al., J. Pharm. Sci. 2004, 93, 1390-1402). Разработка лекарственных форм с высокой концентрацией белка, пригодных для самостоятельного введения

пациентом, является общей проблемой для получения и доставки, когда белковый препарат даёт конечный раствор с высокой вязкостью.

Распределение заряда в mAbs изучалось с точки зрения влияния на характер изменения вязкости растворов mAb (Ydav et al., *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 791-802). Также было показано, что слабые неспецифические взаимодействия зарядов, которые сохраняются в разбавленных растворах, влияют на вязкость концентрированных растворов mAb (Connolly et al., *Biophys. J.*, 2012, 103, 69-78.). Способы снижения вязкости растворов mAb включали введение сайт-направленных мутаций с обменом заряда, которые нарушают непосредственные межмолекулярные взаимодействия зарядов (Ydav et al., *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 791-802), или добавление солей или противоионов (Liu et al., *J. Pharm. Sci.* 2005, 94, 1928-1940; Yadav et al., *J. Pharm. Sci.* 2010, 99, 1152-1168; Yadav et al., *J. Pharm. Sci.* 2012, 101, 998-1011; Kanai et al., *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 4219-4227). Однако, добавление солей или противоионов может вызвать у пациента побочные эффекты с учётом гиперосмолярности вводимого раствора.

В настоящей заявке раскрываются антитела к TREM-1, полученные с использованием сайт-специфической мутации CDR гуманизированного mAb к TREM-1 0170 из Международной заявки WO 2013/120553. Раскрываемые антитела не нарушают непосредственные межмолекулярные взаимодействия заряд-заряд в mAb, но имеют благоприятный профиль вязкости и сохраняют профиль связывания с мишенью. Благоприятный профиль вязкости позволяет получать лекарственный препарат с высокими концентрациями, что может иметь существенное значение для терапевтического и фармацевтического применения. Такие антитела могут оказывать значительное влияние на качество жизни субъектов с сепсисом или хроническим воспалительным заболеванием, например, таким как ревматоидный артрит, псориатический артрит и воспалительное заболевание кишечника.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Главный аспект изобретения относится к mAb против TREM-1 (анти-TREM-1 mAb), профиль вязкости которого находится в интервале, предполагаемом для мономерных mAbs, и которое блокирует функцию TREM-1 также эффективно, как mAb0170 из Международной заявки WO 2013/120553. В дополнение к предпочтительным профилям вязкости вариантов mAbs по изобретению указанные варианты не проявляют агонизма к TREM-1 рецептору.

Один аспект изобретения относится к антителу или его фрагменту, которые способны связываться с и блокировать TREM-1, характеризующимся тем, что антитело или фрагмент указанного антитела имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 80 мг/мл, предпочтительно, менее 4 сП.

Антитело или его фрагмент могут содержать вариант последовательности SEQ ID NO: 3, где один или более отрицательно заряженных остатков в областях CDR1 и CDR3 SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки, согласно настоящему описанию.

Антитело или его фрагмент могут содержать вариант последовательности SEQ ID NO: 3, где фенилаланин в положении 32 SEQ ID NO 3 в результате мутации заменён на аминокислоту, выбранную из аминокислотных остатков глицина, серина, треонина, цистеина, аланина, валина, лейцина, изолейцина и метионина, предпочтительно, выбранную из аланина, глицина, серина, валина и лейцина, более предпочтительно, где F32 в SEQ ID NO: 3 в результате мутации заменён на аланин или серин.

Антитело или его фрагмент могут содержать вариант последовательности SEQ ID NO: 2, где любой из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 в SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 в SEQ ID NO 3 (мутации “Fab-Fab взаимодействия”) заменён на другую аминокислоту, например, такую как природная аминокислота, предпочтительно, на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.

Другой аспект изобретения относится к антителу, или его фрагменту, которые способны специфически связываться с и блокировать TREM-1 с последовательностью SEQ ID NO: 1, и содержат варианты последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или обеих, причём варианты выбраны из группы, состоящей из мутаций “Fab-Fab взаимодействия”, мутаций “Fab-TREM-1 взаимодействия” и мутаций “charge patch” в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 (Таблица 1).

В одном варианте антитела или его фрагмента по изобретению один или более отрицательно заряженных остатков в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки. Согласно одному варианту отрицательно заряженные остатки в областях CDR1 и CDR3 в SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки.

Согласно одному варианту антитело или его фрагмент по изобретению содержат вариант SEQ ID NO 3, где один или более “charge patch” остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 в SEQ ID NO: 3 мутирован в (заменён на) аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина. Согласно одному варианту более одного остатка “charge patch” D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 в SEQ ID NO 3 мутирован в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.

Согласно одному варианту один из остатков E27 и E97 в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO 3 заменён на незаряженный аминокислотный остаток, например такой как остаток аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина. Например, E27 в SEQ ID NO 3 может оставаться неизменённым, а E97 может быть заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина. Или же остаток E97 в SEQ ID NO 3 может оставаться неизменённым, а остаток E27 может быть заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.

Согласно одному варианту как E27, так и E97 в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки, например такие как аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина. Например, E27 в SEQ ID NO 3 может быть заменён на глутамин, E97 в SEQ ID NO 3 может быть заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина,

глутамин, треонин, цистеин и тирозин, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин.

В другом аспекте изобретения предусматривается антитело или его фрагмент, содержащие вариант SEQ ID NO 2, где любой из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 последовательности SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 последовательности SEQ ID NO: 3 (мутации "Fab-Fab взаимодействия") заменён на другую аминокислоту, например, такую как природная аминокислота, предпочтительно, на остаток аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из глицин, аланин, серин, аспарагин, глутамин, треонин, цистеин, лизин, аргинин, триптофан, гистидин и тирозин.

Согласно одному варианту антитела или его фрагмента по изобретению по меньшей мере один из остатков A59 и N57 последовательности SEQ ID NO: 2 заменён на остаток аминокислоты, например такой как природная аминокислота, предпочтительно, аминокислота, выбранная из группы, состоящей из глицин, аланин, серин, аспарагин, глутамин, треонин, цистеин, лизин, аргинин, триптофан, гистидин или тирозин, более предпочтительно, серин или тирозин. Например, остаток A59 в SEQ ID NO: 2 может оставаться неизменённым, а остаток N57 может быть заменён на другой аминокислотный остаток, например, такой как остаток природной аминокислоты, предпочтительно, выбранный из группы, состоящей из глицин, аланин, серин, аспарагин, глутамин, треонин, цистеин, лизин, аргинин, триптофан, гистидин и тирозин, более предпочтительно, из серина или тирозина. Или же, остаток N57 в SEQ ID NO: 2 может оставаться неизменённым, а остаток A59 последовательности SEQ ID NO 2 может быть мутирован в другой аминокислотный остаток, например, такой как остаток природной аминокислоты, предпочтительно, выбранный из группы, состоящей из глицин, аланин, серин, аспарагин, глутамин, треонин, цистеин, лизин, аргинин, триптофан, гистидин и тирозин, более предпочтительно, из серина или тирозина. Согласно другому варианту как A59, так и N57 в SEQ ID NO: 2 заменены на другой аминокислотный остаток, например, такой как остаток природной аминокислоты, предпочтительно, выбранный из группы, состоящей из глицин, аланин, серин, аспарагин, глутамин, треонин, цистеин, лизин, аргинин, триптофан, гистидин и тирозин, более предпочтительно, из серина или тирозина.

Другой аспект изобретения относится к улучшенной доклинической оценочной величине, полученной путём введения сайт-направленных мутаций в SEQ ID NO: 3 в аминокислотные остатки “Fab-TREM-1 взаимодействия” с целью достижения такой же аффинности mAb к TREM-1 яванского макака, как и к человеческому TREM-1 с SEQ ID NO: 1, как например, когда остаток Phe в SEQ ID NO: 3 заменён на Ala или Ser.

Таким образом, в изобретении предусматривается антитело или его фрагмент, в которых аминокислотный остаток “Fab-TREM-1 взаимодействия”, F32 в SEQ ID NO: 3, заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, треонина, пролина и цистеина.

Другой аспект изобретения относится к суммарному эффекту улучшенных вязкостных свойств и улучшенной доклинической оценочной величине, полученной путём введения сайт-направленных мутаций в SEQ ID NO: 2 в области контакта mAb- TREM-1 для достижения такой же аффинности mAb к TREM-1 яванского макака, как и к человеческому TREM-1 с SEQ ID NO: 1 (например, описанной выше), в комбинации с заменой отрицательно заряженных остатков в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 на незаряженные аминокислотные остатки (например, описанные выше).

Согласно любому из вышеописанных аспектов в изобретении предусматривается антитело или его фрагмент, в которых:

i) по меньшей мере один отрицательно заряженный остаток в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина; и

ii) по меньшей мере один из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 последовательности SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 последовательности SEQ ID NO: 3 (мутации “Fab-Fab взаимодействия”) заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, и триптофана, гистидина и тирозина.

Согласно одному варианту в изобретении предусматривается антитело или его фрагмент, в которых:

i) один или оба остатка из E27 и E97 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён/заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина; и

ii) один или оба остатка из A59 и N57 последовательности SEQ ID NO: 2 заменён/заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.

Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, содержащим любую из последовательностей SEQ ID NOs с 4 до 16.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фигуре 1 показан профиль вязкости mAb вариантов к TREM-1 и построение их экспоненциальных кривых.

На Фигуре 2 показана способность mAb 0170 вариантов ингибировать передачу сигнала человеческого TREM-1 в линии клеток, содержащих человеческий ген-репортёр TREM-1 (BWZ'36/hTREM-1), стимулированную PGN и (A) рекомбинантным PGLYRP1 или (B) PGLYRP1, экспрессируемым активированными нейтрофилами (среднее для N доноров).

На Фигуре 3 показана способность mAb 0170 вариантов ингибировать передачу сигнала TREM-1 в линии клеток, содержащих ген-репортёр TREM-1 яванского макака (TE426.27), стимулированную PGN и рекомбинантным PGLYRP1.

На Фигуре 4 показана способность mAb 0170 вариантов ингибировать высвобождение TNF α из M2 макрофагов в условиях гипоксии, стимулированное PGN и рекомбинантным PGLYRP1.

На Фигуре 5 показан агонистический потенциал связанных с планшетом mAb 0170 вариантов по их способности индуцировать высвобождение TNF из M2 макрофагов в условиях гипоксии. В качестве положительного контроля использовали MAb 1278 (R&D).

На Фигуре 6 показан гидродинамический радиус mAb вариантов к TREM-1 по сравнению с mAb 0170.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

TREM-1 представляет собой трансмембранный белок, который состоит из 234 аминокислот, включая один внеклеточный иммуноглобулиновый домен и короткий цитоплазматический хвост без видимого мотива, участвующего в передаче сигнала. Будучи активированным TREM-1 ассоциируется с ITAM-содержащим адаптерным белком сигнального пути, DAP12. Последующая передача сигнала может включать активацию фактора транскрипции NFAT, вызывающего активацию продуцирования провоспалительных цитокинов.

Настоящее изобретение относится к антителам, способным специфически связываться с и блокировать функцию TREM-1. Антитела по изобретению могут блокировать функцию TREM-1, снижая/блокируя активацию TREM-1 и последующую передачу сигнала.

Антитела по изобретению могут блокировать TREM-1 по одному механизму или посредством комбинации нескольких различных механизмов, блокирующих TREM-1 прямо или опосредованно. Например, антитела по изобретению могут предупреждать образование функционального комплекса природного лиганда TREM-1, пептидогликан-распознающего белка 1 (PGLYRP1), с TREM-1, и/или антитела по изобретению могут блокировать TREM-1, предупреждая образование димеров или мультимеров из индивидуальных молекул TREM-1. Димеризацию или мультимеризацию TREM-1 можно понизить или предупредить с помощью антител к TREM-1, способных связываться с участком TREM-1, который в противном случае локализовался бы на поверхности контакта TREM-1 димера, тем самым предупреждая ассоциацию отдельных молекул TREM-1 друг с другом.

Димеризацию или мультимеризацию TREM-1 можно понизить или предупредить с помощью антител к TREM-1, которые препятствуют взаимодействию TREM-1 с его лигандом. Антитела согласно настоящему изобретению могут блокировать PGLYRP1-индуцированную активацию TREM-1. PGLYRP1, высококонсервативный белок протяженностью 196 аминокислот, состоящий из сигнального пептида и пептидогликан-

связывающего домена, экспрессируется в нейтрофилах и высвобождается в момент их активации. Антитела по настоящему изобретению могут подавлять высвобождение провоспалительных цитокинов из миелоидных клеток. Антитела по настоящему изобретению могут блокировать высвобождение TNF, MIP-1бета, MCP-1, IL-1бета, GM-CSF, IL-6 и/или IL-8 из макрофагов, нейтрофилов, синовиальных клеток и/или “репортёрной” клетки по данному описанию.

Антитела по изобретению могут обладать способностью связывать как человеческий TREM-1, так и TREM-1 другого вида, отличного от человека. Таким образом, в данном контексте термин “TREM-1” охватывает любую природную форму TREM-1, которую можно получить из любого подходящего организма. Например, TREM-1 для применения по данному описанию может быть TREM-1 позвоночных, например, TREM-1 млекопитающих, как например, TREM-1 примата (например, человека, шимпанзе, макака яванского или макака резус); грызуна (например, такого как мышь или крыса), зайцеобразного (например, такого как кролик) или парнокопытного (например, такого как корова, овца, свинья или верблюд). Предпочтительно, TREM-1 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1). TREM-1 может представлять собой зрелую форму TREM-1, такую как белок TREM-1 который подвергся посттрансляционному процессингу в подходящей клетке. Такой зрелый TREM-1 белок может, например, быть гликозилированным. TREM-1 может представлять собой полноразмерный TREM-1 белок.

Антитела по изобретению могут представлять собой моноклональные антитела в том смысле, что они, прямо или опосредованно, получены из одного клона В лимфоцитов. Антитела к TREM-1 можно продуцировать, подвергать скринингу и очищать, применяя методы, описанные в разделе Примеры Международной заявки WO2013/120553. Коротко говоря, соответствующую мышь, например, мышь, нокаутированную (KO) по TREM-1 или по TREM-1/TREM-3, можно иммунизировать белком TREM-1, клеткой, экспрессирующей TREM-1, или их комбинацией.

Антитела по изобретению могут быть поликлональными в том смысле, что они являются смесью моноклональных антител по настоящему изобретению.

Первичный скрининг супернатантов гибридом можно осуществлять методом прямого ELISA или FMAT, а для вторичного скрининга можно использовать метод

проточной цитометрии. Положительные супернатанты гибридом можно подвергнуть затем скринингу в анализе гена-репортёра.

Антитела можно рекомбинантно экспрессировать в прокариотических или эукариотических клетках. Прокариотическая клетка может представлять собой клетку *E. coli*. Эукариотическая клетка может представлять собой клетку дрожжей, клетку насекомого или млекопитающего, например, клетку, полученную из организма, который является организмом примата (такого как человек, шимпанзе, яванский макак или макак резус), грызуна (например, такого как мышь или крыса), зайцеобразного (например, такого как кролик) или парнокопытного (например, такого как корова, овца, свинья или верблюд). Подходящие линии клеток млекопитающих включают, но без ограничения, клетки НЕК293, СНО клетки и HELA клетки. Антитела к TREM-1 можно получать другими методами, известными специалистам в данной области техники, например, методом фагового дисплея или дрожжевого дисплея.

После получения антитела можно подвергать скринингу на связывание, например, с полноразмерным TREM-1 или его мутантом, применяя методы, описанные в разделе Примеры Международной заявки WO2013/120553.

Функциональные антитела к TREM-1 по настоящему изобретению представляют собой антитела, которые способны специфически связывать TREM-1 и которые оказывают влияние на активацию TREM-1 и последующую передачу сигнала посредством блокирования или стимулирования TREM-1, и эти антитела в данном описании называются “функциональными антителами к TREM-1”. Способ идентификации функционального антитела к TREM-1 включает (a) культивирование первой клетки, экспрессирующей TREM-1, белок, участвующий в передаче сигнала, и “репортёрную” конструкцию; (b) количественное определение активности первой клетки, когда указанная клетка инкубируется с TREM-1 модифицирующим агентом; (c) контактирование совместной культуры со стадии (b) с антителом к TREM-1; и (d) определение величины, на которую активность первой клетки меньше или больше активности, определённой на стадии (b).

“Первая клетка” на стадии (a) может представлять собой клетку гемопоэтического происхождения, например, такую как миелоидная клетка, такая как Т-клетка. Белок, участвующий в передаче сигнала на стадии (a), может представлять собой любой белок,

участвующий в передаче сигнала, который способен образовывать комплекс с TREM-1. Подходящие белки, участвующие в передаче сигнала, включают DAP10, DAP12, TCR дзета, Fc гамма RIII и Fc рецептор, или их участок. “Репортёрная” конструкция на стадии (a) может представлять собой любую конструкцию, способную активироваться при посредстве белка, участвующего в передаче сигнала, и генерировать распознаваемый сигнал. Подходящие “репортёрные” конструкции содержат фактор транскрипции и ген-репортёр. Белок, участвующий в передаче сигнала, может передавать сигналы через посредство фактора транскрипции, выбранного из группы, состоящей из NFAT и NFkB. Ген-репортёр представляет собой ген, который в естественных условиях не экспрессируется в указанной первой клетке и может представлять собой, но без ограничения, ген, который кодирует β-галактозидазу, люциферазу, зелёный флуоресцентный белок (GFP) или хлорамфеникол трансферазу. Указанную первую клетку можно трансфецировать с использованием фактора транскрипции и гена-репортёра методами, хорошо известными в уровне техники.

Описанная в разделе Примеры “BWZ/hTREM-1 репортёрная клетка” и “TE426.27 репортёрная клетка” является одним из примеров “первой клетки”.

Модифицирующий агент на стадии (b) может представлять собой лиганд к TREM-1 или активированный нейтрофил. “Антитело к TREM-1” на стадии (c) может представлять собой супернатант TREM-1-специфических гибридных антител или очищенное антитело. Активность, количественно определяемая на стадии (d), представляет собой сигнал, продуцируемый репортёрной конструкцией. Примером такой передачи сигнала является люминесценция, вызываемая обусловленным NFAT продуцированием LacZ (β-лактамазы, люциферазы).

Можно специально адаптировать способ для идентификации антитела, блокирующего TREM-1. Способ идентификации антитела, блокирующего TREM-1, включает (a) культивирование первой клетки, экспрессирующей TREM-1, белок, участвующий в передаче сигнала, и “репортёрную” конструкцию; (b) количественное определение активности первой клетки, когда указанная клетка инкубируется с активированным нейтрофилом; (c) контактирование совместной культуры первой клетки с нейтрофилом с антителом к TREM-1; и (d) определение величины, на которую активность первой клетки меньше активности, определённой на стадии (b).

Способ можно также специально адаптировать для идентификации антитела, стимулирующего TREM-1. Способ идентификации антитела, стимулирующего TREM-1, включает (a) культивирование первой клетки, экспрессирующей TREM-1, белок, участвующий в передаче сигнала, и “репортёрную” конструкцию; (b) количественное определение активности первой клетки; (c) контактирование/инкубацию указанной клетки с антителом к TREM-1; и (d) определение величины, на которую активность первой клетки больше активности, определённой на стадии (b).

Настоящее изобретение относится к антителам, блокирующим TREM-1, которые можно идентифицировать раскрываемым в настоящей заявке способом идентификации блокирующего антитела. При тестировании по способу, описанному выше и в разделе Примеры, антитело по настоящему изобретению, в концентрации менее 50 мкг/мл, например, менее 40 мкг/мл, например, менее 30 мкг/мл, например, менее 20 мкг/мл, например, менее 10 мкг/мл, например, менее 5 мкг/мл, и, например, менее 1 мкг/мл – может эффективно снижать активность указанной первой клетки на 50%, например, на 60%, например, на 70%, например, на 80%, например, на 90%, например, на 95%, например, на 100%. Антитело по изобретению может обладать способностью полностью подавлять активность первой клетки. При тестировании по способу, описанному выше и в разделе Примеры, антитело по настоящему изобретению, в концентрации менее 1 мкг/мл – например, менее 0.9 мкг/мл, например, менее 0.8 мкг/мл, например, менее 0.7 мкг/мл, например, менее 0.6 мкг/мл, например, менее 0.5 мкг/мл, например, менее 0.4 мкг/мл, например, менее 0.3 мкг/мл, например, менее 0.2 мкг/мл – может обладать способностью подавлять активность первой клетки.

Настоящее изобретение также относится к антителам, блокирующим TREM-1, которые можно идентифицировать способами, отличными от способа по настоящему изобретению.

В данном контексте термин “антитело” относится к белку с последовательностью, полученной с использованием последовательности иммуноглобулина зародышевой линии, который способен специфически связываться с антигеном (TREM-1) или его участком. Термин включает полноразмерные антитела любого класса или изотипа (а именно, IgA, IgE, IgG, IgM и/или IgY) и любую одиночную цепь или её фрагмент. Антитело, которое специфически связывается с антигеном, или его участком, может связываться

исключительно с этим антигеном, или его участком, или оно может связываться с ограниченным числом гомологичных антигенов, или их участков. Полноразмерные антитела обычно содержат по меньшей мере четыре полипептидных цепи: две тяжёлых (H) цепи и две лёгких (L) цепи, которые связаны между собой дисульфидными связями. Одним подклассом иммуноглобулинов, вызывающим особый интерес в фармацевтике, является семейство IgG. У человека класс IgG можно разделить на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, на основании их последовательности константной области тяжёлой цепи. Лёгкие цепи можно разделить на два типа, каппа и лямбда, исходя из различий в составе их последовательностей. Молекулы IgG состоят из двух тяжёлых цепей, связанных между собой двумя или более дисульфидными связями, и двух лёгких цепей, каждая из которых связана с тяжёлой цепью дисульфидной связью. Тяжёлая цепь может содержать переменную область тяжёлой цепи (VH) и до трёх константных областей тяжёлой цепи (CH): CH1, CH2 и CH3. Лёгкая цепь может содержать переменную область лёгкой цепи (VL) и константную область лёгкой цепи (CL). Области VH и VL можно также подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующимися с более консервативными участками, называемыми каркасными (остовными) областями (FR). Области VH и VL обычно состоят из трёх CDR и четырёх FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Гипервариабельные области тяжёлой и лёгкой цепей образуют [связывающий] домен, который способен взаимодействовать с антигеном, тогда как константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая, но без ограничения, различные клетки иммунной системы (эффекторные клетки), Fc рецепторы и первый компонент (C1q) классического пути системы комплемента.

Антитела по настоящему изобретению можно выделять. Термин “выделенное антитело” относится к антителу, которое выделено и/или регенерировано из другого (других) компонента (компонентов) в среде, в которой оно было получено, и/или которое было очищено от компонентов, присутствующих в среде, в которой оно было получено.

Некоторые антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть пригодными в контексте настоящего изобретения, учитывая, что было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Термин “антигенсвязывающий фрагмент” антитела относится к одному или более фрагменту(-ам)

антитела, который(-е) сохраняет(-ют) способность специфически связываться с антигеном, например, таким как TREM-1 по данному описанию. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (обычно VL и VH домены одного плеча антитела), одноцепочечные Fv (scFv; см., например, Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; и Huston et al. PNAS 1988; 85:5879-5883), dsFv, Fd (обычно VH и CH1 домен) и dAb (обычно VH домен) фрагменты; VH, VL, VhH и V-NAR домены; одновалентные молекулы, содержащие одну VH и одну VL цепь; миниантитела, диатела, триатела, тетратела и каппа антитела (см., например, Ill et al., Protein Eng 1997;10:949-57); IgG верблюда; IgNAR; а также одну или более выделенных областей CDR или функциональный паратоп, где выделенные CDR или антигенсвязывающие остатки или полипептиды могут быть ассоциированы или связаны вместе таким образом, чтобы образовывать функциональный фрагмент антитела. Описание или обзор фрагментов антитела различных типов представлено (представлен), например, в публикации Holliger and Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136; в Международной заявке WO2005040219, и опубликованных патентных заявках США №№ 20050238646 и 20020161201. Эти фрагменты антитела можно получать обычными методами, известными специалистам в данной области техники, и фрагменты можно подвергать скринингу на полезность таким же способом, как и интактные антитела.

Антитело по изобретению может представлять собой человеческое антитело или гуманизированное антитело. Предполагается, что в данном контексте термин "человеческое антитело" включает антитела, содержащие переменные области, в которых по меньшей мере часть каркасной области и/или по меньшей мере часть CDR области получено с использованием последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии. (Например, человеческое антитело может иметь переменные области, полученные с использованием последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека). Далее, если антитело содержит константную область, то константная область также получена с использованием последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с использованием случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*).

Такое человеческое антитело может представлять собой человеческое моноклональное антитело. Такое человеческое антитело может быть получено с

использованием гибридомы, которая включает В клетку трансгенного отличного от человека животного, например, трансгенной мыши, геном которой содержит трансген человеческой тяжёлой цепи и трансген человеческой лёгкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Человеческие антитела могут быть выделены из библиотек последовательностей, созданных отбором последовательностей зародышевой линии человека, далее диверсифицированных с использованием разнообразия природных и синтетических последовательностей.

Человеческие антитела можно получать *in vitro* иммунизацией лимфоцитов человека с последующей трансформацией лимфоцитов, индуцированной вирусом Эпштейна–Барр.

Термин “производное человеческого антитела” относится к любой модифицированной форме человеческого антитела, например, к такой как конъюгат антитела и другого агента или антитела.

Термин “гуманизованное антитело” в данном контексте относится к человеческому химерному антителу/химерному антителу не человеческого происхождения, которое содержит одну или более последовательностей (областей CDR или их участков), которые получены из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Таким образом, гуманизованное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором по меньшей мере остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области антитела нечеловеческого происхождения (донорного антитела), например, антитела мыши, крысы, кролика или низшего примата, которые **обладают** заданной специфичностью, **аффинностью**, **композицией последовательности** и функциональностью. В некоторых примерах остатки FR человеческого иммуноглобулина заменены на соответствующие остатки нечеловеческого происхождения. Примером такой модификации является введение одной или более так называемых обратных мутаций, которые обычно представляют собой аминокислотные остатки из донорного антитела. Гуманизацию антитела можно осуществлять, используя методы рекомбинантных ДНК, известные специалистам в данной области техники (см., например, *Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology*, vol. 248, edited by Benny K. C. Lo). Подходящую

человеческую реципиентную каркасную область для переменного домена как тяжелой, так и легкой цепи можно идентифицировать, например, с использованием гомологии последовательностей или структурной гомологии. Или же можно использовать фиксированные реципиентные каркасные области, например, на основании информации о структуре, биофизических и биохимических свойствах. Реципиентные каркасные области могут быть получены из последовательности зародышевой линии или из последовательности зрелого антитела. Перенос областей CDR донорного антитела можно осуществлять с помощью CDR прививки. CDR привитое гуманизованное антитело можно далее оптимизировать, например, по аффинности, функциональности и биофизическим свойствам посредством идентификации важных положений в каркасной области, при условии, что обратное введение (обратная мутация) аминокислотного остатка из донорного антитела оказывает положительное воздействие на свойства гуманизованного антитела. Помимо обратных мутаций из донорного антитела гуманизованное антитело можно создавать путем введения остатков зародышевой линии в CDR или каркасные области, путем элиминирования иммуногенных эпитопов, с помощью сайт-направленного мутагенеза, созреванием аффинности и т.д.

Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации получают с целью дополнительного уточнения свойств антитела. Как правило, гуманизованное антитело содержит по меньшей мере один – обычно два – переменных домена, в которых все или по существу все CDR области соответствуют CDR областям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения и в которых все или по существу все FR остатки представляют собой FR остатки последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело может, необязательно, содержать также участок константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно участок константной области (Fc) человеческого иммуноглобулина.

Термин “производное гуманизованного антитела” относится к любой модифицированной форме гуманизованного антитела, например, такой как конъюгат антитела и другого агента или антитела.

Термин “химерное антитело” в данном контексте относится к антителу, у которого гены легкой и тяжелой цепей были созданы, обычно методами генной инженерии, при

использовании генов варибельной и константной областей иммуноглобулина, происходящих от различных видов. Например, варибельные сегменты генов мышиноного моноклонального антитела могут быть связаны с сегментами человеческой константной области.

Кристаллизирующийся фрагмент (“Fc область”/”Fc домен”) антитела представляет собой N-концевую область антитела, которая содержит константные домены CH2 и CH3. Fc домен может взаимодействовать с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc рецепторами, а также с некоторыми белками системы комплемента. Fc область обеспечивает возможность взаимодействия антител с иммунной системой. В одном аспекте изобретения могут быть созданы антитела, которые включают модификации в пределах Fc области, обычно с целью изменить одно или более их функциональных свойств, в том числе, например, таких как период полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецепторами, устойчивость белка и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность, или их отсутствие. Также антитело по изобретению можно модифицировать химическими методами (например, один или более химических агентов могут связываться с антителом) или модифицировать с целью изменить его гликозилирование, опять же для того, чтобы изменить одно или более функциональных свойств антитела. IgG1 антитело может нести модифицированный Fc домен, **содержащий** одну или более, и, возможно, все нижеприведённые мутации, которые приводят к пониженной аффинности к некоторым Fc рецепторам (L234A, L235E и G237A) и к пониженной C1q-опосредованной фиксации комплемента (A330S и P331S), соответственно (нумерация остатков в соответствии с EU-индексом).

Антитела по изобретению могут иметь изотип IgG, например, такой как IgG1, такой как IgG2, такой как IgG4. При необходимости класс антитела можно “переключать” известными методами. Например, класс антитела, которое было первоначально получено как IgM антитело, можно переключить, получая IgG антитело. Методы переключения классов антител можно применять для превращения одного IgG подкласса в другой, например: из IgG1 в IgG2 или IgG4; из IgG2 в IgG1 или IgG4; или из IgG4 в IgG1 или IgG2. Можно также конструировать константные области молекул химерного антитела, комбинируя области из различных с IgG подклассов.

Согласно одному варианту шарнирную область СН1 модифицируют таким образом, что число цистеиновых остатков изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Этот способ подробнее описан, например, Bodmer et al. в патенте США № 5,677,425.

Константную область можно модифицировать с целью стабилизировать антитело, например, чтобы уменьшить риск разделения бивалентного антитела на два одновалентных фрагмента VH-VL. Например, в константной области IgG4 остаток S228 (нумерация остатка в соответствии с EU индексом) может быть заменён на остаток пролина (P), чтобы стабилизировать образование дисульфидного мостика в шарнирной области (см., например, Angal *et al.*, Mol Immunol. 1995; 30: 105-8).

Антитела или их фрагменты можно также определять с точки зрения их областей, определяющих комплементарность (CDR). В данном контексте термин “область, определяющая комплементарность” или “гипервариабельная область”, относится к областям антитела, в которых находятся аминокислотные остатки, участвующие в связывании с антителом. Области гипервариабельности, или CDR, можно идентифицировать как области с наивысшей вариабельностью при выравнивании аминокислотных последовательностей вариабельных доменов антител. Для идентификации CDR можно использовать базы данных, например, базу данных Kabat, в соответствии с которой CDR, например, определяются как содержащие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-59 (L2) и 89-97 (L3) вариабельного домена лёгкой цепи 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) вариабельного домена тяжёлой цепи; (Kabat *et al.* 1991; Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Или же CDR можно определять как остатки из “гипервариабельной петли” (остатки 26-33 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене лёгкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжёлой цепи; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196: 901-917). Обычно нумерацию аминокислотных остатков в этой области осуществляют по методу, описанному в публикации Kabat et al., см. выше. В данном контексте такие выражения, как “положение по Kabat”, “остаток по Kabat” и “в соответствии с Kabat” относятся к этой системе нумерации для вариабельных доменов тяжёлой цепи или для вариабельных доменов лёгкой цепи. Если использовать систему нумерации по Kabat, то фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее число аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие сокращению длины

каркасной области (FR) или CDR или инсерции в каркасную область (FR) или в CDR переменного домена. Например, переменный домен может включать инсерции аминокислот. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать инсерции аминокислот (остаток 52a, 52b и 52c по Kabat) после остатка 52 в CDR H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c, etc. по Kabat) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Kabat для данного антитела можно определять при помощи выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью с нумерацией по Kabat.

Термин остатки "каркасной области" или "FR" относится к аминокислотным остаткам VH или VL, которые не находятся в пределах CDR по определению в данном описании.

Антитело mAb 0170 имеет последовательность переменной области тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 2, и последовательность переменной области легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 3. Антитело по изобретению может содержать эту последовательность переменной области тяжелой цепи и/или эту последовательность переменной области легкой цепи. Антитело mAb 0170 имеет последовательности CDR, показанную аминокислотами с 31 по 35, с 50 по 68 и со 101 по 110 последовательности SEQ ID NO: 2 и аминокислотами с 24 по 38, с 54 по 60 и с 93 по 101 последовательности SEQ ID NO: 3.

Тяжелая цепь антитела по изобретению может содержать CDR1 последовательность аминокислот с 31 по 35 (TYAMH) из SEQ ID NO: 2, где одна из этих аминокислот может быть заменена на другую аминокислоту.

Тяжелая цепь антитела по изобретению может содержать CDR2 последовательность аминокислот с 50 по 68 (RIRTKSSNYATYYADSVKD) из SEQ ID NO: 2, где одна, две или три из этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Тяжелая цепь антитела по изобретению может содержать CDR3 последовательность аминокислот со 101 по 110 (DMGQRRQFAY) из SEQ ID NO: 2, где одна, две или три из этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Лёгкая цепь антитела по изобретению может содержать CDR1 последовательность аминокислот с 24 по 38 (RASESVDTFDYSFLH) из SEQ ID NO: 3, где одна, две или три из этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Лёгкая цепь антитела по изобретению может содержать CDR2 последовательность аминокислот с 54 по 60 (RASNLES) из SEQ ID NO: 3, где одна или две из этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Лёгкая цепь антитела по изобретению может содержать CDR3 последовательность аминокислот с 93 по 101 (QQSNEDPYT) из SEQ ID NO: 3, где одна или две этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Антитело mAb 0170 имеет последовательность тяжёлой цепи, показанную в SEQ ID NO: 2, и последовательность лёгкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 3. Антитело по изобретению может содержать эту последовательность тяжёлой цепи или эту последовательность лёгкой цепи. Либо тяжёлая, либо лёгкая цепь антитела по изобретению может являться вариантом mAb 0170. Антитело mAb 0170 имеет CDR последовательности, показанные аминокислотами с 31 по 35, с 50 по 68 и со 101 по 110 из SEQ ID NO: 2 и аминокислотами с 24 по 38, с 54 по 60 и с 93 по 101 из SEQ ID NO: 3. Антитело по изобретению может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 из этих CDR последовательностей.

Тяжёлая цепь антитела по изобретению может содержать CDRH3 последовательность аминокислот со 101 по 110 (DMGIRRQFAY) из SEQ ID NO: 2, где одна, две или три из этих аминокислот могут быть заменены на другую аминокислоту.

Термин “антиген” (Ag) относится к молекулярной частице (химическому соединению, молекуле), применяемой(-ому) для иммунизации иммунокомпетентных клеток позвоночного животного с целью продуцировать антитело (Ab), которое распознаёт Ag. В данном контексте термин Ag трактуется в более широком смысле и, как предполагается, включает целевые молекулы, которые специфически распознаются антителом (Ab), соответственно, включающие фрагменты или миметики молекул, применяемых в процессе иммунизации или другом процессе, например, например, фаговом дисплее, применяемом для получения Ab.

Термин “эпитоп” в данном описании определяется в контексте молекулярного взаимодействия между “антигенсвязывающим полипептидом”, таким как антитело (Ab), и его соответствующим антигеном (Ag). Обычно термин “эпитоп” относится к области или участку на Ag, с которой(-ым) специфически связывается Ab, т.е. к области или участку, находящейся (находящемуся) в физическом контакте с Ab. Физический контакт может определяться с использованием различных критериев (например, интервал среза 2-6Å, например, такой как 3Å, такой как 4 Å, такой как 5Å; или доступность для растворителя) для атомов в молекулах Ab и Ag. Эпитоп на белке может содержать аминокислотные остатки в Ag, которые непосредственно участвуют в связывании с Ab (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, например, такие аминокислотные остатки Ag, которые эффективно блокируются антителом (Ab), т.е. аминокислотные остатки внутри “поверхности, недоступной для растворителя” и/или "области узнавания" Ab.

В данном контексте термин “эпитоп” включает оба типа области связывания на любом конкретном участке TREM-1, который специфически связывается с антителом к TREM-1. TREM-1 может содержать ряд различных эпитопов, которые могут включать, но без ограничения, конформационные эпитопы, состоящие из одной или более несмежных аминокислот, локализованных вблизи друг друга в конформации зрелого TREM-1, и посттрансляционные эпитопы, которые состоят, либо целиком, либо частично, из молекулярных структур, ковалентно связанных с TREM-1, таких как углеводные группы.

Эпитоп для данной пары антитело (Ab)/антиген (Ag) может быть описан и охарактеризован с различной степенью детализации с использованием различных экспериментальных и компьютерных методов эпитопного картирования. Экспериментальные методы включают мутагенез, рентгеноструктурный анализ (РСА, рентгенодифракционный анализ), спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР, NMR), обмен водород–дейтерий в сочетании с масс–спектрометрией (HX-MS) и различные методы конкурентного связывания, известные в уровне техники. Поскольку каждый метод основан на уникальном принципе, описание эпитопа тесно связано с методом его определения. Таким образом, в зависимости от применяемого метода эпитопного картирования эпитоп для данной пары Ab/Ag может быть описан по-разному.

Наиболее подробно эпитоп для взаимодействия между Ag и Ab может быть описан с помощью пространственных координат, определяющих контакты между атомами, возникающие при взаимодействии Ag-Ab, а также с использованием сведений об их относительном вкладе в термодинамику связывания. На более низком уровне детализации эпитоп может быть охарактеризован с помощью пространственных координат, определяющих контакты между атомами Ag и Ab. На ещё более низком уровне детализации эпитоп может быть охарактеризован аминокислотными остатками, которые он содержит, по определению с помощью специфических критериев, таких как расстояние между атомами или доступность для растворителя атомов в комплексе Ab:Ag. На ещё более низком уровне детализации эпитоп может быть охарактеризован с использованием функции, например, с использованием конкурентного связывания с другими Abs. В более общем случае эпитоп можно также определять как содержащий аминокислотные остатки, замена которых на другую аминокислоту изменит характеристики взаимодействия между Ab и Ag.

Если не указано иное или если это не противоречит смыслу, при описании решённой методом РСА кристаллической структуры, которая определяется пространственными координатами комплекса между Ab, например, Fab фрагментом, и его Ag, термин “эпитоп” в данном контексте определяется как остатки TREM-1, характеризующиеся наличием тяжёлого атома (т.е. неводородного атома) в пределах, например, 4 Å от тяжёлого атома в Ab.

Из того факта, что описание и определение эпитопов в зависимости от используемого метода эпитопного картирования получают с различной степенью детализации, следует, что сравнение эпитопов для различных Abs на том же самом Ag следует также проводить с различной степенью детализации.

Считают, что эпитопы, описанные на уровне аминокислот, например, определяемые с помощью РСА, являются идентичными, если они содержат один и тот же набор аминокислотных остатков. Говорят, что эпитопы перекрываются, если по меньшей мере одна аминокислота является общим для эпитопов. Говорят, что эпитопы являются особыми (уникальными), если ни один аминокислотный остаток не является общим для эпитопов.

Эпитопы можно также определять опосредованно, путём сравнения кинетики связывания антител к дикого типа человеческому TREM-1 с кинетикой связывания вариантов человеческого TREM-1, которые содержат мутации аланина в предполагаемых эпитопах. Пониженная аффинность или отмена связывания антитела с вариантами человеческого TREM-1, в которых аминокислотный остаток был заменён на остаток аланина, указывает, что мутантная аминокислота вносит вклад во взаимодействие между указанным антителом и дикого типа человеческим TREM-1. Этот метод обеспечивает отрицательную идентификацию эпитопа. Способ негативно влияет на эффективное определение эпитопа в силу того, что неправильное скручивание или разворачивание белка даёт такие же результаты, что и отмена взаимодействия. Анализ может быть усовершенствован за счёт сравнительного положительного эффекта мутационных анализов функции ортологичного целевого белка (например, TREM-1 яванского макака), если имеется перекрёстно реагирующее антитело. Сравнение позволяет определить различие эпитопов между антителом, которое не вступает в перекрёстную реакцию, например, с TREM-1 яванского макака, и перекрёстно реагирующим антителом.

Косвенную идентификацию эпитопа можно также проводить путём количественного определения связывания антитела (или фрагмента антитела) с вариантами дикого типа антигена (TREM-1). Если антитело или его фрагмент связывают, например, человеческий TREM-1, но не TREM-1 яванского макака, и если указанное антитело или его фрагмент способны связывать частично гуманизированный вариант TREM-1 яванского макака, тогда это восстановленное связывание указывает на то, что заменённый(-е) аминокислотный(-е) остаток (остатки) является/являются важным(-и) для взаимодействия антитела с антигеном. Аналогичным образом повышенная аффинность к гуманизированным вариантам TREM-1 яванского макака антитела к TREM-1 (или его Fab фрагмента), которое слабее связывается с TREM-1 яванского макака по сравнению с человеческим TREM-1, может дать информацию об идентичности остатков, составляющих связывающий эпитоп.

Влияние одних и тех же мутаций на любое данное перекрёстно-реактивное антитело даёт возможность провести различие между возможным неправильным скручиванием белка (отменённым связыванием с обоими антителами) и отсутствием взаимодействия человеческого TREM-1 (связывание с одним из антител и отмена связывания с другим антителом), и в то же время чёткое предоставление информации о различии эпитопов

между антителом, которое не является перекрёстно-реактивным, и антителом, перекрёстно реагирующим, на уровне аминокислот.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать способностью связывать варианты человеческого TREM-1, что установлено, например, методом поверхностного плазмонного резонанса.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать способностью связывать варианты TREM-1 яванского макака, что установлено, например, методом поверхностного плазмонного резонанса.

Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать TREM-1, при этом указанное антитело способно специфически связываться (i) по меньшей мере с одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из A21, T22, K23, L24, T25, E26, и (ii) по меньшей мере один аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, I57, I58, R59, D60, G61, E62, M63, P64, K65, T66, L67, A68, C69, T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, I85, и (iii) по меньшей мере один аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из C113, V114, I115, Y116, Q117, P118 и P119 человеческого TREM-1.

Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать полипептид, содержащий аминокислоты с D38 по F48 последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), что установлено, например, методом HX-MS или методом PCA (дифракции рентгеновских лучей).

Антитело по изобретению может иметь эпитоп, содержащий один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или все из аминокислотных остатков D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 и L45 последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), и один, два или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из E46, K47 и F48 последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), что установлено, например, методом HX-MS или методом PCA (дифракции рентгеновских лучей).

Антитело по изобретению может иметь эпитоп, содержащий одну, две, три или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из D42, E46, D92 и H93

последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), что установлено с использованием вариантов TREM-1 и поверхностного плазмонного резонанса.

Антитело по изобретению может иметь эпитоп, содержащий по меньшей мере аминокислотные остатки E46 и/или D92 из последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), что установлено с использованием вариантов TREM-1 и поверхностного плазмонного резонанса.

Антитело по изобретению может также содержать одну, две или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из L31, I86 и V101 последовательности SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1).

Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать полипептид, содержащий аминокислотные остатки с E19 по L26 TREM-1 макака яванского (SEQ ID NO: 17), , что установлено, например, методом HX-MS или методом PCA (дифракции рентгеновских лучей).

Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать человеческий TREM-1, при этом эпитоп указанного антитела содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48 и A49 последовательности SEQ ID NO: 1.

Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать человеческий TREM-1, при этом эпитоп указанного антитела содержит остаток D42 последовательности SEQ ID NO: 1. Антитело по изобретению может обладать способностью специфически связывать человеческий TREM-1, при этом эпитоп указанного антитела содержит остаток E46 последовательности SEQ ID NO: 1. Эпитоп указанного антитела может содержать остатки V39, C41, D42, Y43, L45 последовательности SEQ ID NO: 1. Эпитоп указанного антитела может содержать остатки E46, K47 и A49 из SEQ ID NO: 1. Эпитоп указанного антитела может также содержать остаток F48 из SEQ ID NO: 1.

Термин “паратоп” произведён от вышеуказанного определения “эпитоп” обращением перспективы. Следовательно, термин “паратоп” относится к области или

участку на антителе, с которым специфически связывается антиген, т.е. посредством которого антитело осуществляет физический контакт с антигеном.

Применительно к разрешённой методом РСА кристаллической структуре, определяемой пространственными координатами комплекса между антителом, например, таким как Fab фрагмент, и его антигеном, термин паратоп в данном описании, если не указано иное или если это не противоречит смыслу, специфически определяется как остатки **антигена**, характеризующиеся наличием тяжёлого атома (например, неводородного атома) с расстоянием 4 Å от тяжёлого атома в TREM-1.

Эпитоп и паратоп для данной пары антитело (Ab)/антиген (Ag) можно идентифицировать стандартными методами. Например, общее расположение эпитопа можно определить, анализируя способность антитела связываться с различными фрагментами или вариантами TREM-1 полипептидов. Специфические аминокислоты в пределах TREM-1, которые вступают в контакт с антителом (эпитоп), и специфические аминокислоты на антителе, которые вступают в контакте с TREM-1 (паратоп), можно также определять стандартными методами. Например, антитело и молекула-мишень могут соединяться и может кристаллизоваться комплекс Ab:Ag. Кристаллическую структуру комплекса можно решать и использовать для идентификации специфических сайтов взаимодействия между антителом и его мишенью.

Антитела, которые связываются с одним и тем же антигеном, можно характеризовать с точки зрения их способности связываться с их общим антигеном одновременно и можно их подвергать “конкурентному связыванию”/“сортировке” (в общие “корзины” по степени связывания). В данном контексте термин “сортировка” относится к методу группировки антител, которые связываются с одним и тем же антигеном. “Сортировка” антител может быть проведена на основании конкурентного связывания двух антител с их общим антигеном в обычных анализах, например, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR, ППР), ELISA (ИФА) или проточная цитометрия.

“Корзину” антитела определяют, используя эталонное антитело. Если второе антитело не способно связываться с антигеном в то же самое время, что и эталонное антитело, то говорят, что второе антитело “лежит” в той же “корзине” (принадлежит к той же группе), что и эталонное антитело. В этом случае эталонное и второе антитело

конкурентно связываются с одной и той же частью антигена и обозначаются термином “конкурентные антитела”. Если второе антитело способно связываться с антигеном в то же самое время, что и эталонное антитело, то говорят, что второе антитело “лежит” в отдельной “корзине”. В этом случае эталонное антитело и второе антитело не осуществляют конкурентное связывание с одним и тем же участком антигена и именуются “неконкурентными антителами”.

“Сортировка”, “группировка” антител не даёт непосредственного представления об эпитопе. Конкурентные антитела, т.е. антитела, принадлежащие к одной и той же “корзине”, могут иметь идентичные эпитопы, перекрывающиеся эпитопы или даже разные эпитопы. Последние бывают в том случае, когда эталонное антитело, связанное с его эпитопом на антигене, занимает место, необходимое для контакта второго антитела с его эпитопом на антигене (“пространственные затруднения”). Неконкурентные антитела обычно имеют различные эпитопы.

Антитело по изобретению может конкурировать с mAb 0170 за связывание с человеческим TREM-1. Антитело по изобретению может конкурировать с mAb 0170 за связывание с TREM-1 яванского макака. Другими словами антитело по изобретению может принадлежать к той же “корзине”, что и mAb 0170.

Термин “аффинность связывания” в данном контексте относится к количественному определению эффективности ковалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, между антителом или его фрагментом и антигеном. Термин “аффинность связывания” применяется для описания одновалентных взаимодействий (собственной активности).

Аффинность связывания двух молекул, например, антитела или его фрагмента и антигена, посредством взаимодействия одновалентных частиц, можно определять количественно путём определения равновесной константы диссоциации (K_D). В свою очередь K_D можно определять посредством количественного определения кинетики образования и диссоциации комплексов, например, методом SPR. Константа скорости реакции, соответствующая ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называют константой скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}), соответственно. K_D относится к k_a и к k_d согласно уравнению $K_D = k_d / k_a$.

Согласно приведённому выше определению аффинность связывания, ассоциированную с различными молекулярными взаимодействиями, например, сравнение аффинности связывания различных антител для данного антигена, можно проводить посредством сравнения значений K_D для отдельных комплексов антитело/антиген.

Антитело по изобретению может связывать человеческий TREM-1 с аффинностью (K_D), которая составляет 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее или 1×10^{-9} М или менее или 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее, 1×10^{-12} М или менее или 1×10^{-13} М или менее, что установлено методом поверхностного плазмонного резонанса. Антитело по изобретению может связывать TREM-1 яванского макака с аффинностью (K_D), составляющей 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, или 1×10^{-9} М или менее, или 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее, 1×10^{-12} М или менее, или 1×10^{-13} М или менее, по определению методом поверхностного плазмонного резонанса.

Термин “специфичность связывания” в данном контексте относится к взаимодействию молекулы, например, антитела, или её фрагмента, с одним единственным антигеном или с ограниченным числом высокомолекулярных антигенов (или эпитопов). Напротив, антитела, способные специфически связываться с TREM-1, не способны связывать молекулы разного характера. Антитела по изобретению могут не обладать способностью связывать Nkr44, белок (рецептор), связанный с естественной киллерной клеткой p44.

Специфичность взаимодействия и значение равновесной константы связывания можно определять непосредственно общеизвестными методами. Стандартные анализы по определению способности лигандов (например, таких, как антитела) связывать их мишени известны в уровне техники и включают, например, анализы ELISA, Вестерн-блоттинг, RIA (РИА) и анализ методом проточной цитометрии. Кинетику связывания и аффинность связывания антитела также можно определять стандартными анализами, такими как SPR (поверхностный плазмонный резонанс, ППР).

Можно проводить анализ конкурентного связывания, в котором связывание антитела с мишенью сравнивают со связыванием мишени другим лигандом этой мишени, например, таким, как другое антитело.

В другом аспекте настоящего изобретения предусматриваются композиции и препараты, содержащие молекулы по изобретению, например, такие как антитела к TREM-1, полинуклеотиды, векторы и клетки, описанные в данной заявке. Например, в изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, которая содержит одно или более антител к TREM-1 по изобретению, приготовленных вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Соответственно, одной целью изобретения является предоставление фармацевтической композиции, содержащей такое антитело к TREM-1, которое присутствует в концентрации от 10 до 200 мг/мл, и при этом указанная композиция имеет рН от 2.0 до 10.0, например, рН от 4.0 до 8.0. Препарат может также содержать одну или более буферную систему, консервант, агент, регулирующий тоничность, хелатирующий агент, стабилизатор и/или поверхностно-активное вещество (ПВА), а также различные их комбинации. Применение консервантов, изотонических агентов, хелатирующих агентов, стабилизаторов и ПВА в фармацевтических композициях хорошо известно специалисту. Можно сделать ссылку на справочник Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Согласно одному варианту фармацевтический препарат представляет собой водный препарат. Такой препарат обычно представляет собой раствор или суспензию, но может также включать коллоиды, дисперсии, эмульсии и многофазные материалы. Термин “водный препарат” (состав) определяется как препарат, содержащий по меньшей мере 50% вес. воды. Аналогично, термин “водный раствор” определяется как раствор, содержащий по меньшей мере 50 % вес. воды, а термин “водная суспензия” определяется как суспензия, содержащая по меньшей мере 50 % вес. воды.

Согласно другому варианту фармацевтический препарат представляет собой лиофилизированный препарат, к которому врач или пациент перед употреблением добавляет растворители и/или разбавители.

В другом аспекте фармацевтический препарат содержит водный раствор такого антитела и буфер, причём антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или выше, и указанный препарат имеет рН от примерно 2.0 до примерно 10.0, например рН от 4.0 до 8.0.

Антитела к TREM-1 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, могут применяться для лечения воспалительных заболеваний, таких, как приведённые ниже, включая: воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона (CD), язвенный колит (UC), синдром раздражённого кишечника, ревматоидный артрит (RA), псориаз, псориатический артрит, системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, диабет типа I, болезнь Грейвса (базедову болезнь), рассеянный склероз (MS), аутоиммунный миокардит, болезнь Кавасаки, ишемическую болезнь сердца, хроническую обструктивную болезнь лёгких, интерстициальное заболевание лёгких, аутоиммунный тиреоидит, склеродермию, системную склеродермию, остеоартрит, атопический дерматит, витилиго, болезнь трансплантат–против–хозяина, синдром Шегрена, аутоиммунный нефрит, синдром Гудпасчера, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, аллергию, астму и другие аутоиммунные заболевания, которые являются результатом либо острого, либо хронического воспаления.

Антитела к TREM-1 по изобретению могут быть пригодны для применения при терапии субъектов с воспалительным заболеванием кишечника. Воспалительное заболевание кишечника (IBD) представляет собой заболевание, которое может поражать любой участок желудочно–кишечного тракта от языка до ануса, вызывая широкий ряд симптомов. Прежде всего, IBD вызывает боль в области живота, диарею (которая может быть кровавой), рвоту и потерю в весе, но может также вызывать осложнения вне желудочно–кишечного тракта, например, кожную сыпь, артрит, воспаление глаза, повышенную утомляемость и снижение концентрации. Пациентов с IBD можно разделить на два основных класса: пациентов с язвенным колитом (UC) и пациентов с болезнью Крона (CD). CD обычно включает подвздошную кишку и толстую кишку, она может поражать любой участок кишечника, но часто является не сплошной (сосредоточенной на областях заболевания по всему кишечнику). UC всегда включает прямую кишку (толстую кишку) и имеет бóльшую протяжённость. При CD воспаление является трансмуральным, приводя к абсцессам, свищам и сужениям, тогда как при UC воспаление обычно ограничивается слизистой оболочкой. Фармацевтические средства, а также хирургические методы лечения болезни Крона неизвестны, тогда как некоторые пациенты с UC могут быть вылечены путём хирургического удаления ободочной (толстой) кишки. Варианты лечения ограничиваются контрольными симптомами, поддержанием ремиссии и предупреждением возврата болезни. Эффективность лечения воспалительного заболевания кишечника в

клинике можно количественно определять как уменьшение величины (в баллах) Индекса активности болезни Крона (CDAI) для CD, который определяется по шкале баллов на основании лабораторных тестов и на основании Опросника по качеству жизни. На животных моделях эффективность измеряется главным образом увеличением веса, а также индексом активности заболевания (DAI), который представляет собой комбинацию показателей, характеризующих консистенцию стула, вес и наличие крови в кале.

Антитела к TREM-1 по изобретению могут быть пригодны для применения при лечении субъектов с ревматоидным артритом. Ревматоидный артрит (РА) является системным заболеванием, которое поражает почти весь, если не весь, организм и является одной из наиболее распространённых форм артрита. Это воспаление сустава, которое вызывает боль, скованность, разогревание, покраснение и отёк. Это воспаление является результатом инвазии суставов воспалительными клетками, и эти воспалительные клетки высвобождают ферменты, которые могут расщеплять кость и хрящ. В результате это воспаление может привести к тяжёлому поражению кости и хряща и к разрушению хряща и вызывать сильную боль, наряду с прочими физиологическими эффектами. Вовлечённый сустав может терять свою форму и правильное положение, что приводит к боли и к потере подвижности.

Имеется несколько животных моделей для ревматоидного артрита, известных в уровне техники. Например, на модели коллаген-индуцированного артрита (CIA) у мышей развивается воспалительный артрит, который похож на ревматоидный артрит у людей. Так как CIA имеет аналогичные РА иммунологические и патологические признаки, это делает его подходящей моделью для скрининга на потенциальные противовоспалительные соединения для терапии человека. Эффективность на этой модели количественно определяют уменьшением отёчности суставов. Эффективность действия (препарата) на РА в клинике количественно определяют способностью уменьшить симптомы у пациентов, которая измеряется как комбинация показателей, отражающих отёк сустава, скорость оседания эритроцитов, уровни С-реактивного белка и уровни сывороточных факторов, таких как антитела к цитруниллированным белкам.

Антитела к TREM-1 по изобретению могут быть пригодны для применения при лечении субъектов с псориазом. Псориаз представляет собой опосредуемое Т-клетками воспалительное заболевание кожи, которое может вызвать значительный дискомфорт. Это

заболевание, для лечения которого в настоящее время нет средства, и оно поражает людей всех возрастов. Хотя субъекты с лёгким течением псориаза часто могут контролировать своё заболевание с помощью местнодействующих средств, более чем одному миллиону пациентов по всему миру требуется лечение с помощью ультрафиолетового излучения или системная иммуносупрессивная терапия. К сожалению, неудобство и повышенный риск ультрафиолетового излучения и токсичность многих препаратов ограничивают их продолжительное применение. Более того, у пациентов обычно наблюдается рецидив псориаза, и в некоторых случаях возобновление симптомов наблюдается вскоре после прекращения иммуносупрессивной терапии. Разработанная в последнее время модель псориаза на основе переноса CD4+ Т клеток имитирует многие аспекты псориаза человека и, следовательно, может быть использована для идентификации соединений, подходящих для применения в терапии псориаза (Davenport et al., *Internat. Immunopharmacol* 2:653-672, 2002). Эффективность на этой модели количественно определяют уменьшением патологических явлений на коже, используя систему подсчёта баллов. Аналогично, эффективность у пациентов количественно определяют уменьшением патологических явлений на коже.

Антитела TREM-1 по изобретению могут быть пригодны для применения в терапии субъектов с псориатическим артритом. Псориатический артрит (РА) представляет собой тип воспалительного артрита, который возникает в подгруппе пациентов с псориазом. У этих пациентов патологические изменения кожи/симптомы сопровождаются отёком суставов, аналогичным отёку суставов, наблюдаемому при ревматоидным артритом. Для них характерны пятнистые выпуклые красные воспалённые участки кожи с образованием псориатических чешуек. Псориаз часто поражает верхушки локтей и коленей, волосистую часть головы, пупок и области вокруг гениталий или ануса. Примерно у 10% пациентов с псориазом также наблюдается связанное с ним воспаление суставов.

Термин “терапия”, “лечение” в данном контексте относится к лекарственной терапии любого нуждающегося в этом человека или другого животного субъекта. Предполагается, что указанный субъект прошёл объективное обследование практикующего врача или ветеринара, поставившего предварительный или окончательный диагноз, который предписывает, что применение указанной терапии является благотворным для здоровья указанного человека или другого животного субъекта. Продолжительность и цель указанной терапии могут меняться от одного субъекта к другому, в зависимости от многих

факторов, например, таких состояние здоровья субъекта в данный момент. Так, указанная терапия может быть профилактической, паллиативной, симптоматической и/или лечебной.

Что касается настоящего изобретения, то профилактическая, паллиативная, симптоматическая и/или лечебная терапия может представлять отдельные аспекты изобретения.

Антитело по изобретению можно вводить парентерально, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно. Или же антитело по изобретению можно вводить непарентеральным способом, например, перорально или местно. Антитело по изобретению можно вводить профилактически. Антитело по изобретению можно вводить терапевтически (при необходимости).

Первый аспект изобретения основан на наблюдении, что замена отрицательно заряженных остатков областей CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 (вариабельная область лёгкой цепи mAb 0170) влияет на вязкость mAb. В этом первом аспекте изобретения mAb по изобретению представляет собой вариант mAb 0170, имеющий тяжёлую цепь и лёгкую цепь, причём лёгкая цепь mAb 0170, а именно, SEQ ID NO: 3, содержит мутации, в которых отрицательно заряженные остатки в областях CDR1 и CDR3 SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные остатки. Соответственно, один аспект изобретения относится к варианту mAb 0170, содержащему замену любого остатка или любой комбинации остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 из SEQ ID NO: 3 на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина. Иными словами, представляющий интерес вариант изобретения относится к антителу или его фрагменту, содержащим SEQ ID NO: 2 (или её вариант) в качестве тяжёлой цепи, а в качестве лёгкой цепи содержащим вариант SEQ ID NO: 3, в котором любой остаток или любая комбинация остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 из SEQ ID NO: 3 заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина. Эти мутации именуется “charge patch” мутациями. Согласно предпочтительному варианту по меньшей мере один или оба остатка из E27 и E97 областей CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки, такие, как аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина. Согласно

предпочтительному варианту такая аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина. Согласно предпочтительному варианту остаток E27 областей CDR1 и CDR3 SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин. Согласно другому варианту остаток E27 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин. Согласно другому варианту остаток E97 остаётся неизменённым, а остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин.

Другой аспект изобретения основан на наблюдении, что димеры Fab-Fab образовались в результате взаимодействий в области паратопа. Так как mAbs содержит два фрагмента Fab, было предположено, что mAbs будут способны к мультимеризации, которая может оказывать влияние на вязкостные свойства. Таким образом, следующий аспект изобретения направлен на изменение остатков в области взаимодействия Fab-Fab SEQ ID NO: 2 (а именно, в варибельной области тяжёлой цепи mAb 0170) для снижения Fab-Fab димеризации. В данном контексте эти мутации называются мутациями по типу “Fab-Fab взаимодействие”. Соответственно, один аспект изобретения относится к замене любого из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ. ID NO 3 на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина. Иными словами представляющий интерес вариант изобретения относится к антителу или его фрагменту, содержащим вариант SEQ ID NO: 2, в котором любой из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 последовательности SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 последовательности SEQ. ID NO 3 (мутации “Fab-Fab взаимодействия”) заменены на другую аминокислоту, такую как природная аминокислота, предпочтительно, на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.

Предпочтительно, по меньшей мере один из остатков A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина. Согласно одному варианту остаток A59 остаётся неизменённым, а остаток N57 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина. Согласно другому варианту остаток N57 остаётся неизменённым, а остаток A59 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина. Согласно по меньшей мере одному варианту как остаток A59, так и остаток N57 заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.

В представляющем интерес варианте i) по меньшей мере один из заряженных остатков областей CDR1 и CDR3 из SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, и ii) по меньшей мере один из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ. ID NO 3 (мутации по типу “Fab-Fab взаимодействие”) заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина и триптофана, гистидина и тирозина.

Согласно соответствующему варианту один или оба из остатков E27 и E97 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён/заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, и один или оба из остатков A59 и N57 последовательности SEQ ID NO: 2 заменён/заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.

Другой аспект изобретения основан на наблюдении, что замена на Ala в положении Y90 последовательности SEQ. ID NO 1 TREM-1 повышала аффинность SEQ. ID NO 3 к TREM-1. Было найдено, что Y90 взаимодействует с фенилаланиновым в остатком последовательности SEQ ID NO: 3. Мутации SEQ ID NO: 3 с целью повысить эффективность взаимодействия Fab-TREM-1 называются мутациями по типу Fab-TREM-1 взаимодействие. Согласно одному варианту данного аспекта изобретения фенилаланин в положении 32 в SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислоту, выбранную из аминокислотных остатков глицина, серина, треонина, цистеина, аланина, валина, лейцина, изолейцина и метионина, предпочтительно, выбранную из аланина, глицина, серина, валина и лейцина. Согласно интересующему варианту изобретения остаток F32 в SEQ ID NO: 3 заменён на аланин или серин.

Мутации “charge patch” в CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 уменьшали гидродинамический радиус (Rh), тогда как мутации в области Fab-Fab взаимодействия увеличивали Rh (Фигура 6). Мутации в сайте “Fab-TREM-1 взаимодействия” не влияли на Rh и оказывали очень небольшое влияние на вязкость (Фигуры 6 и 1, Таблицы 3С и 3Е).

	mAb ID	Содержат последовательность ID No.	Мутация(-и) в SEQ ID NO: 2 или 3	Цепь
Мутации Charge patch	0317	SEQ ID NO: 4 и 2	E27Q, E97S	L
	0318	SEQ ID NO: 5 и 2	E27Q, E97Q	L
	0319	SEQ ID NO: 6 и 2	E97S	L
	0320	SEQ ID NO: 7 и 2	E97Q	L
	0321	SEQ ID NO: 8 и 2	E27Q	L
Мутации Fab-Fab взаимодействия	0324	SEQ ID NO: 11 и 3	A59Y	H
	0325	SEQ ID NO: 12 и 3	N57S	H
	0326	SEQ ID NO: 13 и 3	A59Y,N57S	H
Мутации Fab-TREM-1 взаимодействия	0322	SEQ ID NO: 9 и 2	F32A	L
	0323	SEQ ID NO: 10 и 2	F32S	L
Мутации Charge patch и Fab-TREM-1 взаимодействия	0330	SEQ ID NO: 14 и 2	F32A, E27Q, E97Q	L
Мутации Charge patch и Fab-Fab взаимодействия	0332	SEQ ID NO: 15 и 5	A59Y/E27Q, E97Q	H/L
Charge patch, Fab-TREM-1 взаимодействие и Fab-Fab взаимодействие	0333	SEQ ID NO: 14 и 16	A59Y/F32A, E27Q, E97Q	H/L

Таблица 1: Обзор полученных вариантов SEQ ID NO (0170) mAb. L = лёгкая цепь, H = тяжёлая цепь.

Вязкость для mAb 0170 вариантов определяли, используя DLS (динамическое рассеяние света) или микрореологию (структурную реологию) и показали, что как мутации “charge patch”, так и мутации “Fab-Fab взаимодействия” снижали вязкость. Было найдено, что mAb вариант 0318, который содержит charge patch мутации E27Q и E97Q, имеет самую низкую вязкость.

Определяли кинетику связывания вариантов mAb 0170, соответственно, с TREM-1-Fc человека и с TREM-1-Fc яванского макака. Было обнаружено, что все варианты mAb 0170 обладают сходной аффинностью к человеческому TREM-1-Fc. Интересно отметить, что было найдено, что mAb вариант, SEQ ID NO: 9, содержащий мутацию “Fab-TREM-1 взаимодействия” обладает повышенной аффинностью к TREM-1-Fc яванского макака (Таблица 2).

TREM-1-Fc человека				TREM-1-Fc яванского макака		
mAb	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)
0170	3E+06	5E-04	0.1	0.3E+06	4E-04	2
0317	4E+06	6E-04	0.2	0.3E+06	7E-04	3
0318	3E+06	7E-04	0.2	0.3E+06	7E-04	2
0319	4E+06	6E-04	0.2	0.3E+06	6E-04	2
0320	4E+06	7E-04	0.2	0.2E+06	6E-04	3
0321	3E+06	6E-04	0.2	0.3E+06	6E-04	2
0322	3E+06	3E-04	0.1	0.6E+06	1E-04	0.1
0323	2E+06	6E-04	0.3	0.4E+06	2E-04	0.6
0324	3E+06	8E-04	0.3	0.2E+06	6E-04	4
0325	4E+06	3E-04	0.08	0.2E+06	6E-04	1
0326	3E+06	7E-04	0.2	0.2E+06	3E-04	5
0330	2E+06	3E-04	0.1	0.6E+06	7E-05	0.1
0332	3E+06	1E-03	0.4	0.2E+06	8E-04	4
0333	2E+06	5E-04	0.3	0.4E+06	1E-04	0.3

Таблица 2: Аффинность анти-TREM-1 mAb вариантов к TREM-1-Fc человека и TREM-1-Fc яванского макака, соответственно.

Согласно одному варианту, обладающему как повышенной аффинностью к TREM-1, так и низкой вязкостью, мутации из SEQ ID NO: 9 объединяли с мутациями в SEQ ID NO: 5, чтобы получить лёгкую цепь из SEQ ID NO: 14, и мутации из лёгкой цепи из SEQ ID NO: 14 объединяли также с мутациями в тяжёлой цепи из SEQ ID NO: 16. Повышенная аффинность к TREM-1-Fc яванского макака сохранялась у mAb вариантов, содержащих

совместные мутации из SEQ ID NO: 14 и мутации, которые не оказывают негативного влияния на аффинность к человеческому TREM-1-Fc. Соответственно, варианты изобретения, содержащие как “charge patch” мутации, так и мутации “Fab-TREM-1 взаимодействия”, предусматриваются в настоящем изобретении, также, как варианты изобретения, содержащие мутации “charge patch” и мутации “Fab-Fab взаимодействия”, также, как варианты изобретения, содержащие как мутации “Fab-Fab взаимодействия”, так и мутации “Fab-TREM-1 взаимодействия”, и варианты изобретения, включающие мутации “Fab-Fab взаимодействия”, мутации “Fab-TREM-1 взаимодействия” и “charge patch” мутации.

mAb					
0170		0317		0318	
Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)
100.0	26.0	85.0	2.9	85.0	1.9
80.0	14.5	63.8	2.2	63.8	1.9
60.0	6.0	42.5	1.9	42.5	2.0
40.0	3.1	17.0	1.3	17.0	1.2
20.0	1.6	10.2	1.2	10.2	1.2
12.0	1.3	3.4	1.1	3.4	1.2
4.0	1.1	0.0	1.0	0.0	1.0
0.0	0.9				

Таблица 3А: Вязкость в зависимости от концентрации белка для mAb 0170, 0317 и 0318

mAb					
0319		0320		0321	
Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)
85.0	2.2	107.0	7.8	106.0	5.9
63.8	2.3	80.3	3.7	79.5	3.0
42.5	2.0	53.5	2.5	53.0	2.0
17.0	1.2	26.8	1.6	26.5	1.6
10.2	1.1	13.4	1.3	13.3	1.2
3.4	1.1	6.7	1.2	6.6	1.1
0.0	1.0	3.3	1.1	3.3	1.1
		0.0	1.0	0.0	0.9

Таблица 3В: Вязкость в зависимости от концентрации белка для mAb 0319, 0320 и 321.

mAb					
0322		0323		0324	
Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)

100.0	16.4	101.0	21.3	103.0	5.4
75.0	4.9	75.8	11.3	77.3	3.1
50.0	3.3	50.5	3.7	51.5	2.2
25.0	2.0	25.3	2.6	25.8	1.6
12.5	1.6	12.6	2.0	12.9	1.4
6.3	1.4	6.3	1.4	6.4	1.3
3.1	1.3	3.2	1.2	3.2	1.2
0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.9

Таблица 3С: Вязкость в зависимости от концентрации белка для mAb 0322, 0323 и 324.

mAb					
0325		0326		0330	
Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)
95.0	7.8	109.0	7.5	104.5	3.8
71.3	3.7	81.8	3.1	50.5	2.1
47.5	2.3	54.5	2.2	23.9	1.4
23.8	1.6	27.3	1.6	9.4	1.3
11.9	1.3	6.8	1.5	4.7	1.1
5.9	1.3	3.4	1.1	1.9	1.1
3.0	1.2	0.0	0.9	1.0	1.3
0.0	1.0				

Таблица 3D: Вязкость в зависимости от концентрации белка для mAb 0325, 0326 и 0330.

mAb			
0332		0333	
Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)	Концентрация белка (мг/мл)	Вязкость (сП)
114.1	5.9	113.2	5.2
53.6	2.1	47.1	2.1
22.2	2.2	24.9	2.0
9.0	2.2	9.0	1.8
4.6	1.8	4.5	1.5
1.9	1.2	1.8	1.6
1.1	1.1	0.9	1.4

Таблица 3Е: Вязкость в зависимости от концентрации белка для mAb 0332 и 0333.

Неограничивающие варианты по настоящему изобретению включают также:

1. Антитело или его фрагмент, способные связываться с и блокировать TREM-1 последовательности SEQ ID NO: 1, характеризующееся тем, что антитело или фрагмент указанного антитела имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 50 мг/мл, как например, менее 4 сП, предпочтительно, менее 3 сП (при этом способ определения вязкости в зависимости от концентрации представляет собой стандартный способ или способ по данному описанию).

2. Антитело, или его фрагмент, способные связываться с и блокировать TREM-1, характеризующиеся тем, что антитело или фрагмент указанного антитела имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 80 мг/мл, как например, менее 4 сП (при этом способ определения вязкости в зависимости от концентрации представляет собой стандартный способ или способ по данному описанию).

3. Антитело или его фрагмент согласно вариантам 1 или 2, которые блокируют TREM-1 функцию с KD к SEQ ID NO: 1 менее 0.5 нМ, как например, менее 0.4 нМ, предпочтительно, 0.3 нМ или менее.

4. Антитело или его фрагмент, которые конкурируют с mAb 0170 за связывание с SEQ ID NO: 1 и имеют такой профиль вязкости, при котором:

(a) антитело или фрагмент указанного антитела имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 50 мг/мл, как например, менее 4 сП, предпочтительно, менее 3 сП ; или

(b) антитело или фрагмент указанного антитела имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 80 мг/мл, предпочтительно, менее 4 сП.

5. Антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с и блокировать TREM-1, при этом антитело или его фрагмент имеют мутации “Fab-Fab взаимодействия” из SEQ ID NO: 2.

6. Антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с и блокировать TREM-1 с SEQ ID NO: 1, при этом антитело или его фрагмент имеют мутации “charge patch”, такие, что по меньшей мере один из отрицательно заряженных остатков в областях CDR1 и CDR3 из SEQ ID NO: 3 заменён на незаряженные остатки.

7. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, в которых отрицательно заряженные аминокислоты заменены на аминокислотные остатки, которые могут образовывать водородные связи с партнёрами, например, такие как в случае мутации остатка Asp и Glu в любой из остатков Asn, Gln, Ser и Thr.

8. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, имеющие пониженную вязкость по сравнению с mAb 0170, но тем не менее имеющие K_D к SEQ ID NO: 1 ниже 0.5 нМ.

9. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, имеющие пониженную вязкость по сравнению с mAb 0170, K_D к SEQ ID NO: 1 менее 0.5 нМ и K_D к SEQ ID NO: 17 менее 0.6 нМ, в результате замены незаряженных аминокислот из SEQ ID NO: 2 и/или 3, участвующих в специфических "Fab-Fab взаимодействиях", на аминокислоты изменённого размера или с возможностью связывания водородной связью.

10. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, которые способны специфически связываться с и блокировать TREM-1 с последовательностью SEQ ID NO: 1 и содержат варианты из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или обеих, при этом варианты выбраны из группы, состоящие из мутаций "Fab-Fab взаимодействия", мутаций "Fab-TREM-1 взаимодействия" и мутаций "charge-patch" последовательностей SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

11. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, содержащие мутации "Fab-TREM-1 взаимодействия", например, такие, в которых остаток Phe из SEQ ID NO: 3 заменён на Ala или Ser.

12. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов изобретения, которые конкурируют с SEQ ID NO: 2 или 3 за связывание с SEQ ID NO: 1 и которые имеют эпитоп, содержащий один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или все из аминокислотных остатков D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 и L45 и один, два или все из аминокислотных остатков E46, K47, F48 из последовательности SEQ ID NO: 1.

13. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов изобретения, которые конкурируют за связывание с SEQ ID NO: 3 и содержат LC, в которой один или оба остатка глутамата (E) в положениях 27 и 97 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на серин (S) или глутамин (Q), как в случае E27Q, E97S, или при этом оба остатка, E27 и E97, заменены на глутамин, или остаток E27 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на S (E27, E97S), или остаток E27 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на Q (E27, E97Q), или остаток E97 остаётся неизменённым, а остаток E27 заменён на Q или S, более предпочтительно, на Q (E27, E97Q).

14. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов изобретения, содержащие последовательность SEQ ID NO: 3, в которой фенилаланин в положении 32 (F32) заменён, например, заменён на A (mAb 0322) или на S (mAb 0323).

15. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов изобретения, содержащие последовательность SEQ ID NO: 2, в которой один или оба остатка, N57 и A59, заменены, например, таким образом, что остаток A59 заменён на тирозин, или остаток N57 заменён на серин, или таким образом, что остаток N57 заменён на серин, а остаток A59 заменён на тирозин.

16. Антитело или его фрагмент, содержащие вариант SEQ ID NO: 2, в котором незаряженные аминокислоты, участвующие в специфических Fab-Fab взаимодействиях, заменены на аминокислоты изменённого размера или с возможностью связывания водородной связью, как например, в случае, когда аланин (A) или аспарагин (N) заменены на любой из остатков Ser, Thr, Phe, Tyr и Trp.

17. Антитело или его фрагмент, которые содержат вариант SEQ ID NO: 3 и которые конкурируют за связывание с SEQ ID NO: 3, где один или оба остатка глутамата (E) в положениях 27 и 97 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на серин (S) или глутамин (Q), например, при этом оба остатка, E27 и E97, заменены на глутамин (318), или при этом остаток E27 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на S (E27, E97S), или при этом остаток E27 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на Q (E27, E97Q), или при этом остаток E97 остаётся неизменённым, а остаток E27 заменён на Q или S, более предпочтительно, на Q (E27, E97Q).

18. Антитело или его фрагмент, которые содержат вариант SEQ ID NO: 2 и которые конкурируют за связывание с SEQ ID NO: 2, где один или оба остатка, остаток N57 и остаток A59, изменены, например, при этом остаток A59 заменён на тирозин или при этом остаток N57 заменён на серин, или при этом остаток N57 заменён на серин, а остаток A59 заменён на тирозин.

19. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 4.
20. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 5.
21. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 6.
22. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 7.
23. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 8.
24. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 9.
25. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 10.
26. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 11.
27. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 12.
28. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 13.
29. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 14.
30. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 15.
31. Антитело или его фрагмент, содержащие SEQ ID NO: 16.
32. Антитело или его фрагмент, содержащие любую из SEQ ID NOs: 4 – 16.
33. Композиция, содержащая антитело по определению в любом из вариантов 1-32.

34. Антитело по изобретению, такое, как в вариантах 1-32, для применения в качестве лекарственного средства.

35. Антитело по изобретению, такое, как в вариантах 1-32, для применения в терапии заболевания, выбранного из воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

36. Антитело согласно варианту 35, при этом заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита и воспалительного заболевания кишечника.

37. Применение антитела по изобретению, такого, как в соответствии с любым из вариантов 1-32, для приготовления лекарственного средства для терапии заболевания, выбранного из группы, состоящей из воспалительного заболевания или из аутоиммунного заболевания.

38. Применение согласно варианту 35, где заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита и воспалительного заболевания кишечника.

39. Способ терапии заболевания, выбранного из воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, включающий введение антитела по изобретению (такого, как антитело согласно любому из вариантов 1-32), композиции, содержащей антитело по изобретению, или лекарственного средства, содержащего антитело по изобретению.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Гидродинамический радиус и вязкость mAb0170 вариантов

Было найдено, что гидродинамический радиус mAb0170 из Международной заявки WO2013/120553 больше (9-10 нм), чем нужный (5-6 нм). Гидродинамический радиус определяли методом динамического рассеяния света, используя 96-луночный планшет с планшет-ридером DynaPro (Wyatt Inc.). Использовали аналитические планшеты Corning 3540 (Corning). Общий объем образца был примерно 20 мкл, а температуру поддерживали 25 °C для mAb0170 вариантов (Фигура 6).

Мутации charge patch в CDR1 и CDR3 варибельной области лёгкой цепи уменьшали Rh до уровня, ожидаемого для мономерных mAbs, тогда как мутации в области Fab-Fab взаимодействия, по-видимому, увеличивали Rh. Мутации в сайте Fab- TREM-1 взаимодействия не влияли на Rh.

Вязкость для mAb0170 вариантов 0317, 0318, 0319, 0320, 0321, 0322, 0323, 0324, 0325, 0326 и 0330 определяли методом DLS. Гидродинамический радиус измеряли на планшет-ридере Wyatt DynaPro Platereader, используя чёрные с прозрачным дном необработанные микропланшеты из полистирола Corning 3540 и обычные наносферы из полистирола от компании Phosphorex Inc. со средним диаметром 206.5 нм (номер по каталогу 106). Образцы белков переносили на планшет Corning 3540 и сверху плотно закрывали. Образцы центрифугировали и гидродинамические радиусы образцов белка

измеряли на Wyatt DynaPro DLS планшет-ридере. В каждую лунку добавляли 0.5 мкл полистирольных гранул и осторожно перемешивали с помощью пипетирования. Планшет снова центрифугировали и гидродинамический радиус гранул измеряли на Wyatt DynaPro DLS планшет-ридере.

Вязкость образцов белка рассчитывали по формуле:

Вязкость (белок) = (гидродинамический радиус (гранулы, измер.) × вязкость (буфер))/гидродинамический радиус (гранулы, действ.),

где вязкость (белок) обозначает расчётную вязкость раствора белка, гидродинамический радиус (гранулы, измер.) обозначает измеренный гидродинамический радиус полистирольных гранул в растворе белка, вязкость (буфер) обозначает вязкость буфера и гидродинамический радиус (гранулы, действ.) обозначает действительный средний диаметр гранул [He et al., Anal Biochem, 399, 141-143, 2010].

Вязкость определяли методами микрореологии для mAb0170 вариантов 0332 и 0333. Для реологического анализа использовали шприц Гамильтон LT на 250 мкл (Hamilton-Bonaduz Inc), соединённый с иглой 30G Новофайн (Novofine). Шприц помещали в изготовленный по заказу алюминиевый держатель, закреплённый на платформе. Поршень шприца приводился в движение с помощью анализатора текстуры TAxTPlus Texture Analyzer, который измерял результирующую силу давления на поршень при заданной скорости инъекции. Каждый образец испытывали при трёх различных скоростях инъекции. Скорость поршневой головки и измеряемую силу применяли для расчёта скорости сдвига и напряжения сдвига, соответственно. Вязкость можно выразить в зависимости от скорости сдвига формулой:

$$\eta_{\text{белка}} = \tau_w / \dot{\gamma} = (\Delta P D / 4 L) / ((32 Q) (\pi D^3))$$

где $\eta_{\text{белка}}$ обозначает вязкость раствора белка, $\dot{\gamma}$ обозначает кажущуюся (эффективную) скорость сдвига, τ_w обозначает напряжение сдвига, P обозначает давление в результате движения поршня, Q обозначает скорость потока жидкости при прохождении через капиллярную иглу, а D и L обозначают внутренний диаметр и длину капилляра, соответственно (Allahham et al., 2004; Intl J Pharm 270, 139-148). Вязкость, $\eta_{\text{белка}}$, рассчитывали, используя известные значения D , L и Q и измеренное значение P .

Анализ показал, что как мутации “charge patch”, так и мутации “Fab-Fab взаимодействия” снижали вязкость (Фигура 1). Было обнаружено, что mAb вариант SEQ

ID NO: 5, который содержит charge patch мутации E27Q и E97Q, имеет самую низкую вязкость.

Пример 2: Кинетика mAb0170 вариантов

Определялась кинетика связывания mAb 0170 вариантов с TREM-1-Fc человека и TREM-1-Fc яванского макака, соответственно. Исследование связывания проводили на анализаторе ProteOn (BioRad), который количественно определяет молекулярные взаимодействия в реальном времени методом поверхностного плазмонного резонанса. Эксперименты проводили при 25°C и образцы хранили при 15 °C в камере для образцов. Сигнал (RU, единицы ответа) анализатора ProteOn непосредственно коррелирует с массой на поверхности индивидуального сенсорного чипа в шести параллельных проточных кюветах. Моноклональное анти-человеческое Fc-антитело или поликлональное анти-мышинное Fc-антитело из наборов Bioss иммобилизованных человеческих или мышинных Fc помещали в горизонтальном направлении на проточных кюветах GLM сенсорного чипа согласно инструкциям производителя. Конечный уровень иммобилизованного антитела составлял примерно 2600-6000 RU в каждом эксперименте. Захват очищенных моноклональных мышинных или рекомбинантно экспрессированных антител к hTREM-1 проводили, разбавляя антитела до концентрации 5-10 нМ подвижным (рабочим) буфером (10 мМ Hepes, 0,15 М NaCl, 5 мМ EDTA, 0,05% ПАВ P20, pH 7.4), с последующим впрыском в вертикальном направлении при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 сек, создавая референсные **interspots**, прилегающие ко всем проточным кюветам с единственным иммобилизованным анти-Fc антителом. В результате обычно получали конечные уровни иммобилизованных тестируемых антител примерно 100-300 RU и значения Rmax аналита 30-90 RU. Связывание hTREM-1 или cTREM-1 белков проводили, впрыскивая аналит (антиген) во все проточные кюветы в горизонтальном направлении, чтобы обеспечить возможность сравнительных анализов связывания с различными иммобилизованными антителами к TREM-1 относительно связывания с референсным **interspot**. Готовили серийные разведения белков hTREM-1 или cTREM-1 1:3 в концентрации 1.2-100 нМ или в подвижном буфере, инъецируя со скоростью 100 мкл/мин в течение 250 с и оставляя диссоциировать в течение 600 с. Поверхность GLM регенерировали после каждого цикла инъекций аналита посредством двух впрыскиваний по 18 с 10 мМ глицина, pH 1.7, и 50 мМ NaOH при скорости 100 мкл/мин. На этой стадии регенерации с поверхности с иммобилизованным антителом для захвата удаляли антитело к TREM-1 и любой связанный TREM-1 белок и создавали возможность для последующего связывания следующей пары

взаимодействующих образцов. В процессе регенерации непосредственно иммобилизованное анти-Fc антитело не удаляли с поверхности чипа.

Аффинность связывания между антителами и антигеном количественно измеряли, определяя равновесную константу диссоциации (K_D) посредством кинетических измерений образования и диссоциации комплексов. Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, а именно, k_a (скорость ассоциации) и k_d (скорость диссоциации), получали аппроксимацией данных к модели Ленгмюра 1:1 с использованием для анализа данных программное обеспечение ProteOn. Соотношение между K_D и k_a и k_d выражается уравнением $K_D = k_d / k_a$.

Кривые связывания строили с учётом двух стандартов (вычитание сигналов референсной поверхности, а также контрольных инъекций буферов поверх иммобилизованных антител к TREM-1) перед анализом данных. Это позволяло делать поправку на шум прибора, сдвиг и дрейф массива во время инъекции образца.

Было найдено, что все mAb 0170 обладают аффинностью к человеческому TREM-1-Fc, аналогичной аффинности mAb 0170. Интересно отметить, что mAb варианты, содержащие мутацию “Fab-TREM-1 взаимодействия”, например, mAb 0322, обладали повышенной аффинностью к TREM-1-Fc яванского макака (Таблица 2).

Пример 3: Кинетика и вязкость mAb 0330 и mAb 0333

Для того, чтобы получить mAb, обладающее как повышенной аффинностью к TREM-1 яванского макака, так и низкой вязкостью, мутации из SEQ ID NO 9 комбинировали с мутациями в последовательности SEQ ID NO 5, которая, как было обнаружено, имела самую низкую вязкость среди mAb0170 вариантов, и с SEQ ID NO: 11, которая, как было найдено, оказывала слабое влияние на вязкость. Повышенная аффинность к TREM-1-Fc яванского макака сохранялась для mAb варианта, содержащего комбинированные мутации (mAb 0330 и mAb 0333), и мутации не влияли на аффинность к человеческому TREM-1-Fc. Вязкость mAb0330 и mAb 0333 была заметно ниже по сравнению с mAb 0170 из Международной заявки WO2013/120553 (Фигура 1).

Пример 4: Культивирование стабильной клеточной линии BWZ'36/hTREM-1

“Репортёрные” клетки BWZ/hTREM-1 культивировали в среде RPMI 1640 без фенола красного (Cat# 11835, Gibco, Carlsbad CA, USA), дополненной 10% FCS (Cat# 16140-071, Gibco, New York, USA), 1% Pen/Strep (Cat# 15070-06, Gibco), 1 мМ пирувата натрия (Cat #11360, Gibco), 5 мкМ -2ME (Cat# 31350-010, Gibco) и 2 мМ L-глутамин (Cat # 25030, Gibco). Не потребовалось никаких специальных планшетов или покрытия. Добавляли 10 мл раствора Версена (Cat # 15040, Gibco) для отделения клеток (друг от друга), которые затем переносили в пробирки, центрифугировали при 1200 об/мин 5 мин и отмывали в свежей среде RPMI 1640 без фенола красного. После этого эти клетки были готовы для применения в анализе или их рекультивировали для дальнейшего выращивания.

Пример 5: Функциональная характеристика mAb 0170 вариантов

Способность анти-TREM-1 mAb 0170 вариантов ингибировать передачу сигнала человеческого TREM-1 определяли, используя клеточную линию репортёрных клеток (BWZ'36/hTREM-1), предоставленную компанией Biocell. Клеточную линию репортёрных клеток стимулировали PGN и TREM-1 лигандом PGLYRP1 либо в виде рекомбинантного белка, либо экспрессировали с использованием активированных нейтрофилов перед инкубированием с mAbs. Было найдено, что активность вариантов при ингибировании передачи сигнала TREM-1 является клинически релевантной и сравнимой с активностью mAb 0170 из Международной заявки WO2013/120553 (Фигуры 2А и В).

Аналогично определяли способность ингибировать передачу сигнала TREM-1 макака яванского для трёх mAb0170 вариантов с самой низкой вязкостью и у двух вариантов наблюдали повышенную аффинность к TREM-1 макака яванского. В этом анализе при использовании устойчивой клеточной линии TE 426.27 наблюдали сходную активность mAb вариантов и mAb0170 из Международной заявки WO2013/120553 (Фигура 3).

Также анализировали активность mAb вариантов при блокировании высвобождения TNF α из первичных клеток от здоровых доноров. В этом анализе моноциты дифференцировали в M2 макрофаги в условиях гипоксии, чтобы повысить экспрессию TREM-1, и активировали с помощью PGN и рекомбинантного PGLYRP1 перед инкубированием с mAb. Было найдено, что mAb варианты обладали такой же активностью, что и 0170, при ингибировании опосредованного TREM-1-высвобождения TNF α из M2 макрофагов в условиях гипоксии (Фигура 4).

Пример 6 Кристаллическая структура комплекса Fab 0170-Fab 0170

Способность молекул mAb 0170 специфически взаимодействовать друг с другом определяли методом PCA (рентгеноструктурного анализа, кристаллографического анализа), анализируя структуру кристалла Fab 0170-Fab 0170.

Материалы: Fab фрагмент антитела mAb 0170 (SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19) в буфере, состоящем из 10 mM фосфата, 2.68 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7.4, с концентрацией белка 8.5 мг/мл.

Методы: Fab фрагмент антитела mAb 0170 кристаллизовали методом “висячей капли” посредством диффузии в парах путём уравнивания мелкой капли, состоящей из 2 мкл раствора белка, смешанного с 2 мкл резервуарного раствора против 0.5 мл резервуарного раствора, состоящего из 20% (вес/об) PEG 8000, 200 mM K₂HPO₄. Кристалл переносили в каплю, состоящую из 2 мкл 35% (вес/об) PEG3350, 200 mM K₂HPO₄ и заключали в петлю LithoLoop (Molecular Dimensions Limited) диаметром 0.2 мм и мгновенно охлаждали жидким азотом.

Данные рентгеноструктурного анализа (PCA) регистрировали в MAXLAB 911-2, Lund University, Sweden, используя криопоток, действующий при 100 К. Первичные данные (изображения) индексировали, и изображали в масштабе, используя пакет программ XDS (Kabsch, Acta Crystallogr. D66, 133-144 (2010)). Пространственная группа кристалла P2(1)2(1)2(1), с параметрами элементарной ячейки $a = 62.4 \text{ \AA}$, $b = 110.9 \text{ \AA}$, $c = 158.4 \text{ \AA}$. Данные собирали с разрешением 2.40 \AA . Структура была решена с помощью молекулярного замещения с применением программного обеспечения Phenix (Adams et al., Acta Crystallogr. D66, 213—221 (2010)), реализуемого в пакете программ CCP4i (Potterton et al., Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003)). Моделями поиска служили структуры тяжёлой цепи от pdb entry 1AD0.pdb (85% идентичность) и лёгкой цепи из pdb entry 2QRG (94% идентичность). Уточнение структуры проводили с применением программы Refmac5 (Murshudov et al., Acta Crystallogr. D53, 240-255 (1997)) из пакета программ CCP4i. Программу Coot version 7 (Emsley et al., Acta Crystallogr. D66, 486-501 (2010)) применяли для ручного воспроизведения и подтверждения правильности структуры.

Результаты и подтверждение

Кристаллическая структура mAb 170 Fab области содержала четыре молекулы Fab в асимметричной элементарной ячейке (тяжёлые цепи были помечены A и C, лёгкие цепи

были помечены В и D). Молекулы Fab были упакованы в виде димеров с антигенсвязывающей областью одной молекулы Fab, взаимодействующей с антигенсвязывающей областью другой молекулы Fab. Было невозможно включить и уточнить последний цистеиновый остаток I из SEQ ID NO: 19 в кристаллической структуре, хотя можно было бы ожидать, что он будет связан дисульфидной связью с Cys в SEQ ID NO: 18 из тяжелой цепи. Имелись некоторые указания на избыточную 2Fo-Fc и Fo-Fc электронную плотность в этой области, и возможно, что дисульфидная связь присутствует в подгруппе Fab молекул. На сигма-а взвешенной разностной 2Fo-Fc карте электронной плотности не было значительной электронной плотности для остатков G26, K78-N79, I104-R105 и S138-E141 из SEQ ID NO: 18 в цепи А в асимметричной элементарной ячейке и для E1, G26-F 27, M102-R105, S136-E141, S195-K200 из SEQ ID NO: 18 цепи С в другой молекуле Fab в асимметричной элементарной ячейке. Значительная электронная плотность на сигма-а взвешенной 2Fo-Fc карте отсутствовала также для остатков D30-Y34 из SEQ ID NO: 19 в цепи D. Эти остатки не входили в кристаллическую структуру, но были включены в анализ молекулярного взаимодействия поверхности контакта Fab-Fab посредством наложения с кристаллической структурой фрагмента mAb 0170 из кристаллической структуры раскрываемого в Международной заявке WO2013/120553 гуманизированного анти-TREM-1 mAb 0170.

Параметры качества структуры mAb 0170 Fab фрагмента следующие: общий R-фактор структуры = 24% и свободный R-фактор = 30%. Общий коэффициент корреляции 0.93 и индекс точности дифракция-компонент, DPI = 0.3 Å (Cruickshank, Acta Crystallogr. D55, 583-601 (1999)). Среднее квадратичное отклонение длин связей в структуре от идеальных длин связей = 0.025 Å и среднее квадратичное отклонение от идеальных углов связей = 2.326° (Engh and Huber, Acta Crystallogr. A47, 392-400 (1991)).

Анализ внутримолекулярных расстояний проводили с применением программы NCONT в пакете программ CCP4 (Potterton et al., Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003)) с отсечкой, исключением 4Å для внутримолекулярных расстояний (Таблица 4). Анализ показал, что аминокислотные остатки N57 и A59 из SEQ ID NO: 2 относятся к группе аминокислот, участвующих в Fab-Fab взаимодействиях в кристаллической структуре.

Исходные аминокислоты, Fab 1 (Цепь А и В)	Целевые аминокислоты, Fab 2 (Цепь С и D)
--	---

F32	SEQ ID NO: 3	Y32	SEQ ID NO: 2
F32	SEQ ID NO: 3	M102	SEQ ID NO: 2
D33	SEQ ID NO: 3	Y53	SEQ ID NO: 3
Y34	SEQ ID NO: 3	Y34	SEQ ID NO: 3
Y34	SEQ ID NO: 3	R54	SEQ ID NO: 3
D98	SEQ ID NO: 3	S55	SEQ ID NO: 2
R52	SEQ ID NO: 2	S55	SEQ ID NO: 2
R52	SEQ ID NO: 2	S56	SEQ ID NO: 2
S55	SEQ ID NO: 2	A59	SEQ ID NO: 2
S55	SEQ ID NO: 2	R52	SEQ ID NO: 2
S56	SEQ ID NO: 2	S56	SEQ ID NO: 2
N57	SEQ ID NO: 2	S56	SEQ ID NO: 2
N57	SEQ ID NO: 2	N57	SEQ ID NO: 2
N57	SEQ ID NO: 2	A59	SEQ ID NO: 2
A59	SEQ ID NO: 2	S55	SEQ ID NO: 2
A59	SEQ ID NO: 2	S56	SEQ ID NO: 2
A59	SEQ ID NO: 2	N57	SEQ ID NO: 2
I104	SEQ ID NO: 2	I104	SEQ ID NO: 2
I104	SEQ ID NO: 2	R106	SEQ ID NO: 2
R106	SEQ ID NO: 2	F32	SEQ ID NO: 3

Таблица 4. Предсказанные Fab-Fab взаимодействия на основе наложения кристаллической структуры гуманизированного анти-TREM-1 mAb 0170, раскрываемого в Международной заявке WO2013/120553, на кристаллическую структуру mAb 0170 Fab области по настоящему изобретению.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ново Нордиск А/С

<120> САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ АНТИТЕЛ К ТРЕМ-1

<130> P45251WO-PJG

<150> EP14177547.8

<151> 2014-07-17

<150> EP14194893.5

<151> 2014-11-26

<160> 19

<170> PatentIn вариант 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> БЕЛОК

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
35 40 45

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
50 55 60

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
65 70 75 80

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
85 90 95

Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
100 105 110

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
115 120 125

Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
130 135 140

Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
145 150 155 160

Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
165 170 175

Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
180 185 190

Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile
195 200 205

Leu Leu Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu
210 215 220

Phe Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Val Pro
225 230

<210> 2

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжёлая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 3

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(218)

<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 4
<211> 218
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 5
<211> 218
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<400> 5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 6

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 7

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 8
 <211> 218
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 11

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжёлая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 12

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжёлая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 12

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala

50

55

60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> лёгкая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 14

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжёлая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 16
 <211> 448
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжёлая цепь гуманизированного антитела к TREM-1

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 17
<211> 233
<212> БЕЛОК
<213> *Macaca fascicularis* ЯВАНСКИЙ МАКАК

<400> 17

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr
35 40 45

Ala Asn Ser Arg Lys Ala Trp Gln Lys Met Glu Gly Lys Met Pro Lys
50 55 60

Ile Leu Ala Lys Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln
65 70 75 80

Val Gly Arg Ile Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln
85 90 95

Val Gln Met Thr Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
100 105 110

Val Ile Tyr Gln His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile
115 120 125

Cys Leu Val Val Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu
130 135 140

Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala
145 150 155 160

Leu Gly Pro Arg Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro
165 170 175

Glu Ser Thr Val Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr
180 185 190

Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile Ile
195 200 205

Val Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Phe
210 215 220

Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Gly Pro
225 230

<210> 18

<211> 219

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Экспрессионная конструкция для кристаллизации

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215

<210> 19

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Экспрессионная конструкция для кристаллизации

<400> 19

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, которые способны связываться с и блокировать TREM-1, характеризующиеся тем, что антитело или фрагмент имеют вязкость менее 5 сП при концентрации 80 мг/мл, предпочтительно, менее 4 сП.
2. Антитело или его фрагмент, в которых один или более отрицательно заряженных остатков в области CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженный аминокислотные остатки.
3. Антитело или его фрагмент по п.п. 1 или 2, содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 3, в котором один или более остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 (мутации "charge patch") из SEQ ID NO: 3 заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонин, цистеин и тирозин.
4. Антитело или его фрагмент по п. 3, в которых по меньшей мере один или оба остатка из E27 и E97 из областей CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки, например, аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамин, треонин, цистеин и тирозин.
5. Антитело или его фрагмент по п.п. 3 или 4, в которых остаток E27 из SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина, глутамин, треонин, цистеин и тирозин, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин.
6. Антитело или его фрагмент по п.п. 3 или 4, в которых остаток E97 из SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин, а остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина, глутамин, треонин, цистеин и тирозин, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамин.

7. Антитело или его фрагмент по п.п. 3 или 4, в которых остаток E27 из SEQ ID NO: 3 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
8. Антитело или его фрагмент по п.п. 3 или 4, в которых остатки E27 и E97 из SEQ ID NO: 3 заменены на глутамин.
9. Антитело или его фрагмент по п.п. 3 или 4, в которых остаток E97 из SEQ ID NO: 3 остаётся неизменённым, а остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, более предпочтительно, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
10. Антитело или его фрагмент, содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 2, в которых любой из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ. ID NO 3 (мутации “Fab-Fab взаимодействия”) заменён на другую аминокислоту, например, на такую, как природная аминокислота, предпочтительно, на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
11. Антитело или его фрагмент по п. 8, в которых по меньшей мере один из остатков A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён на остаток аминокислоты, например такой, как природная аминокислота, предпочтительно, выбранная из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.
12. Антитело или его фрагмент по п. 8, в которых остаток A59 из SEQ ID NO: 2 остаётся неизменённым, а остаток N57 заменён на остаток другой аминокислоты, например такой, как природная аминокислота, предпочтительно, выбранная из группы,

состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.

13. Антитело или его фрагмент по п. 8, в которых остаток N57 из SEQ ID NO: 2 остаётся неизменённым, а остаток A59 из SEQ ID NO: 2 заменён на остаток другой аминокислоты, например такой, как природная аминокислота, предпочтительно, выбранная из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.
14. Антитело или его фрагмент по п. 8, в которых как остаток A59, так и остаток N57 из SEQ ID NO: 2 заменены на остаток другой аминокислоты, как например, природной аминокислоты, предпочтительно, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.
15. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 1–13, в которых:
 - i) по меньшей мере один отрицательно заряженный остаток в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён на остаток аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина, и
 - ii) по меньшей мере один из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ ID NO 3 (мутации “Fab-Fab взаимодействия”) заменён на остаток аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, и триптофана, гистидина и тирозина.
16. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 1–13, в которых:
 - i) один или оба остатка E27 и E97 из SEQ ID NO: 3 заменён/заменены на остаток/остатки аминокислоты/аминокислот, выбранной/выбранных из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина; и

- ii) один или оба остатка A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён/заменены на остаток/остатки аминокислоты/аминокислот, выбранной/выбранных из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина, более предпочтительно, из серина или тирозина.

17. Антитело или его фрагмент, содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 3, где фенилаланин в положении 32 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислоту, выбранную из остатков аминокислот глицина, серина, треонина, цистеина, аланина, валина, лейцина, изолейцина и метионина предпочтительно, выбранную из аланина, глицина, серина, валина и лейцина, более предпочтительно, где F32 в SEQ ID NO: 3 заменён на аланин или серин.

18. Антитело или его фрагмент, содержащие любую из последовательностей SEQ ID NO: 4 – 16.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

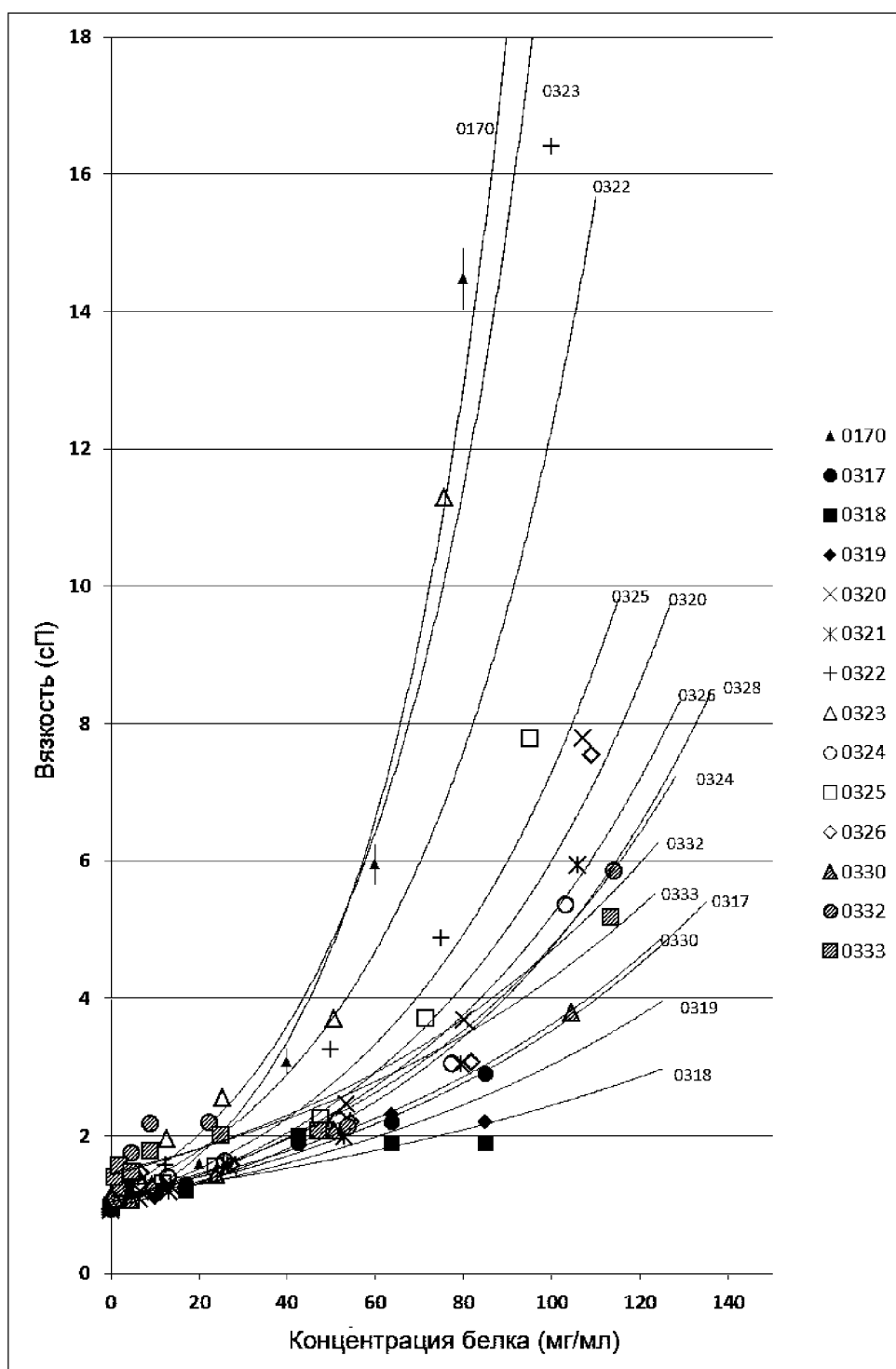
1. Антитело или его фрагмент, которые способны связываться с и блокировать TREM-1, в которых один или более отрицательно заряженных остатков в области CDR1 и CDR3 в аминокислотах 23–38 и 93–101 последовательности SEQ ID NO:3 заменены на незаряженные аминокислотные остатки .
2. Антитело или его фрагмент по п. 1 , содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 3, в котором один или более остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 из SEQ ID NO: 3 заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
3. Антитело или его фрагмент по п. 2, в которых по меньшей мере один или оба остатка E27 и E97 из областей CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 3 заменены на незаряженный аминокислотный остаток.
4. Антитело или его фрагмент по п.3, в которых незаряженный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
5. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 2–4, в которых остаток E27 из SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
6. Антитело или его фрагмент по п. 5, в которых остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
7. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 2–4, в которых остаток E97 из SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин, а остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.

8. Антитело или его фрагмент по п. 7, в которых остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
9. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 2–4, в которых остаток E27 из SEQ ID NO: 3 заменён на глутамин.
10. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 2–4, в которых остаток E27 из SEQ ID NO: 3 остаётся неизменённым, а остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
11. Антитело или его фрагмент по п. 10, в которых остаток E97 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
12. Антитело или его фрагмент по любому из п.п. 2–4, в которых остаток E97 из SEQ ID NO: 3 остаётся неизменённым, а остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
13. Антитело или его фрагмент по п. 12, в которых остаток E27 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из серина и глутамина.
14. Антитело или его фрагмент, которые способны связываться с и блокировать TREM-1, содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 2, где любой из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 заменён на другой аминокислотный остаток, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина; или содержащие вариант SEQ. ID NO 3, где любой из остатков F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ. ID NO 3 заменён на , на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.

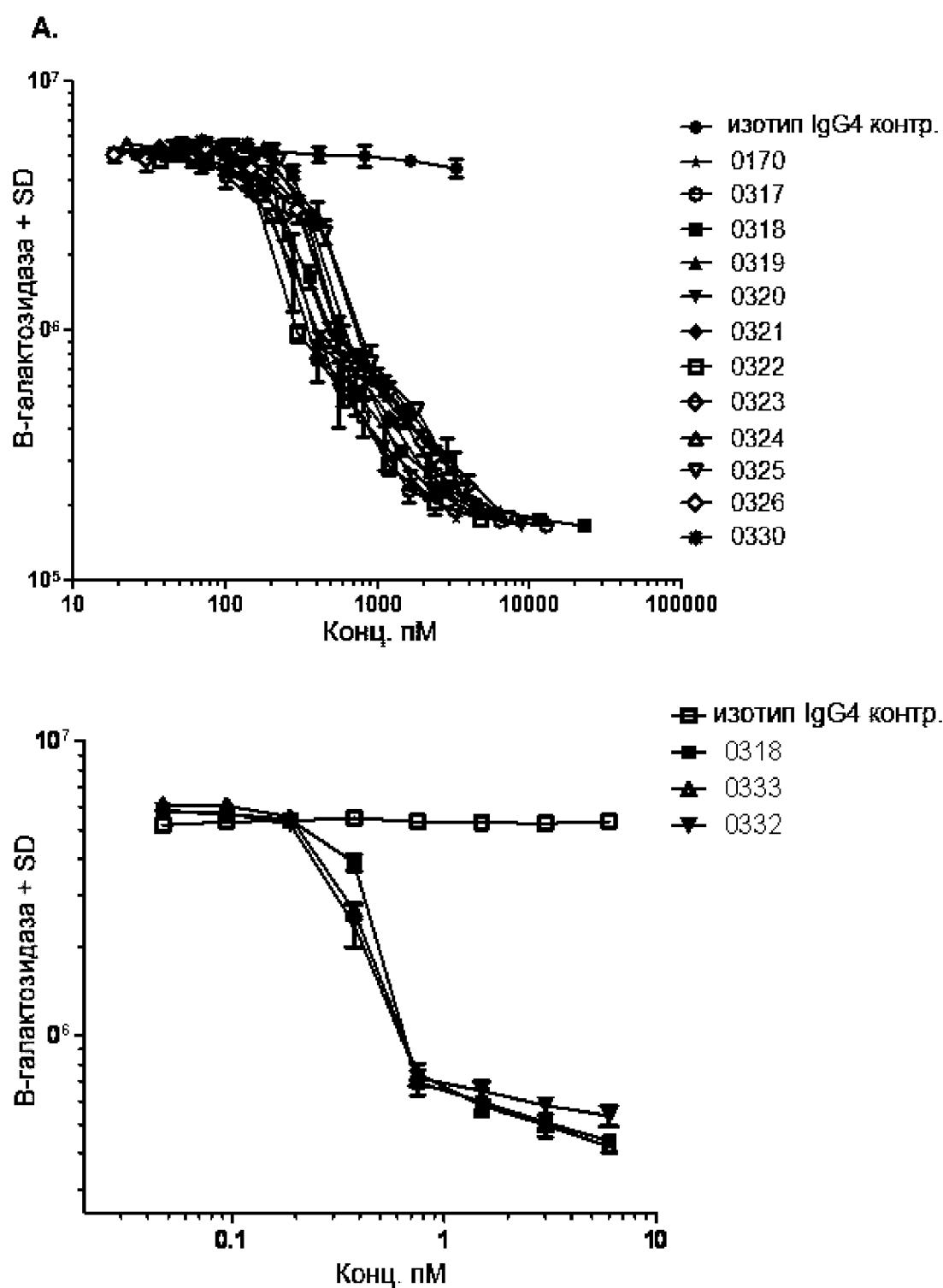
15. Антитело или его фрагмент по п. 14, в которых по меньшей мере один из остатков A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
16. Антитело или его фрагмент по п. 15, в которых по меньшей мере один из остатков A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён на аминокислотный остаток, выбранной из группы, состоящей серина и тирозина.
17. Антитело или его фрагмент по п. 14, в которых остаток A59 из SEQ ID NO: 2 остаётся неизменённым, а остаток N57 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
18. Антитело или его фрагмент по п.17, в которых остаток N57 заменён на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей серина и тирозина.
19. Антитело или его фрагмент по п. 14, в которых остаток N57 из SEQ ID NO: 2 остаётся неизменённым, а остаток A59 из SEQ ID NO: 2 заменён на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
20. Антитело или его фрагмент по п.19, в которых остаток A59 заменён на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей серина и тирозина.
21. Антитело или его фрагмент по п. 14, в которых как остаток A59, так и остаток N57 из SEQ ID NO: 2 заменены на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
22. Антитело или его фрагмент по п. 21, в которых как остаток A59, так и остаток N57 из SEQ ID NO: 2 заменены на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из серина и тирозина.

23. Антитело или его фрагмент по п. 1, в которых по меньшей мере один из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 2 или F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 из SEQ ID NO 3 заменён на другой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, и триптофана, гистидина и тирозина.
24. Антитело или его фрагмент по п. 23, в которых по меньшей мере один отрицательно заряженный остаток из остатков аминокислот 24–38 и 93–101 в областях CDR1 и CDR3 последовательности SEQ ID NO 3 заменён на аминокислотный остаток, выбранной из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
25. Антитело или его фрагмент по п. 3, в которых один или оба остатка A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён/заменены на другой/другие аминокислотный(-е) остаток/остатки, выбранный(-е) из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.
26. Антитело или его фрагмент по п. 25, в которых указанные один или оба остатка E27 и E97 из SEQ ID NO: 3 заменён/заменены на другой/другие аминокислотный(-е) остаток/остатки, выбранный(-е) из группы, состоящей из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина.
27. Антитело или его фрагмент по п. 26, в которых один или оба остатка A59 и N57 из SEQ ID NO: 2 заменён/заменены на другой/другие аминокислотный(-е) остаток/остатки, выбранный(-е) из группы, состоящей из серина и тирозина.
28. Антитело или его фрагмент, способные блокировать TREM-1, содержащие вариант последовательности SEQ ID NO: 3, где фенилаланин в положении 32 последовательности SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, серина, треонина, цистеина, аланина, валина, лейцина, изолейцина и метионина. .

29. Антитело или его фрагмент по п. 28, в которых остаток F32 в SEQ ID NO: 3 заменён на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, глицина, серина, валина и лейцина.
30. Антитело или его фрагмент по п. 28, в которых остаток F32 в SEQ ID NO: 3 заменён на аланин или серин.
31. Антитело или его фрагмент, которые способны связываться с и блокировать TREM-1, содержащие любую из последовательностей SEQ ID NOs: 4 – 16.



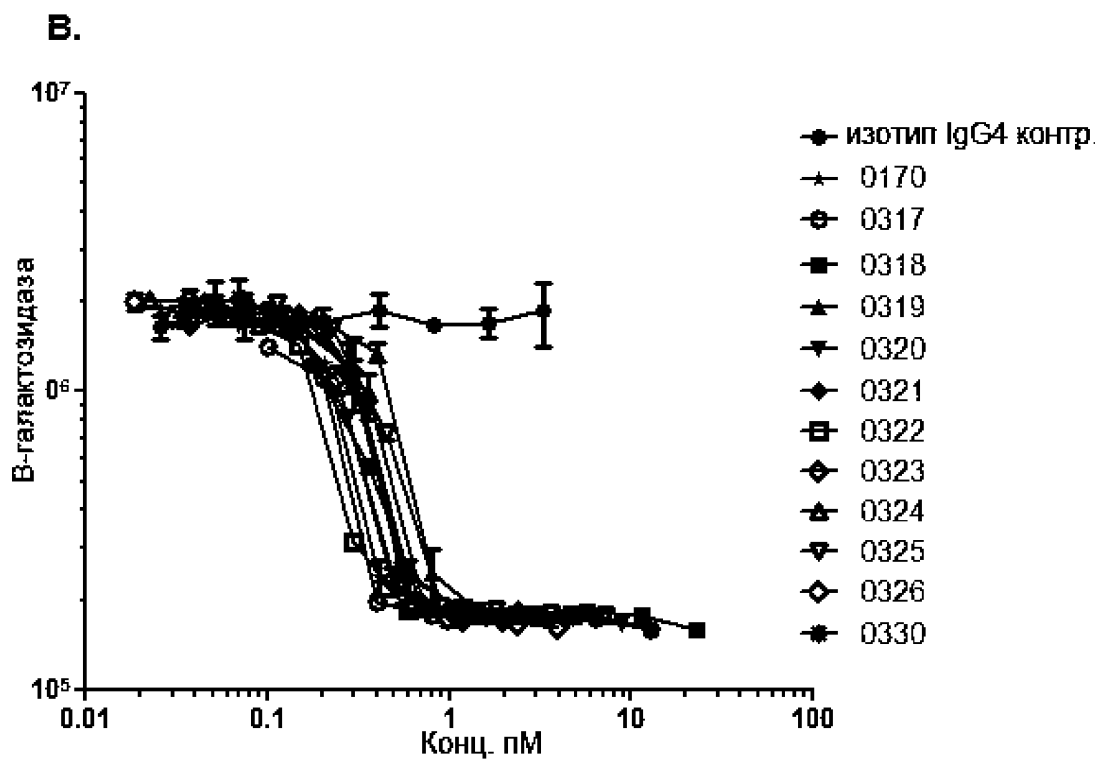
Фигура 1



Фигура 2

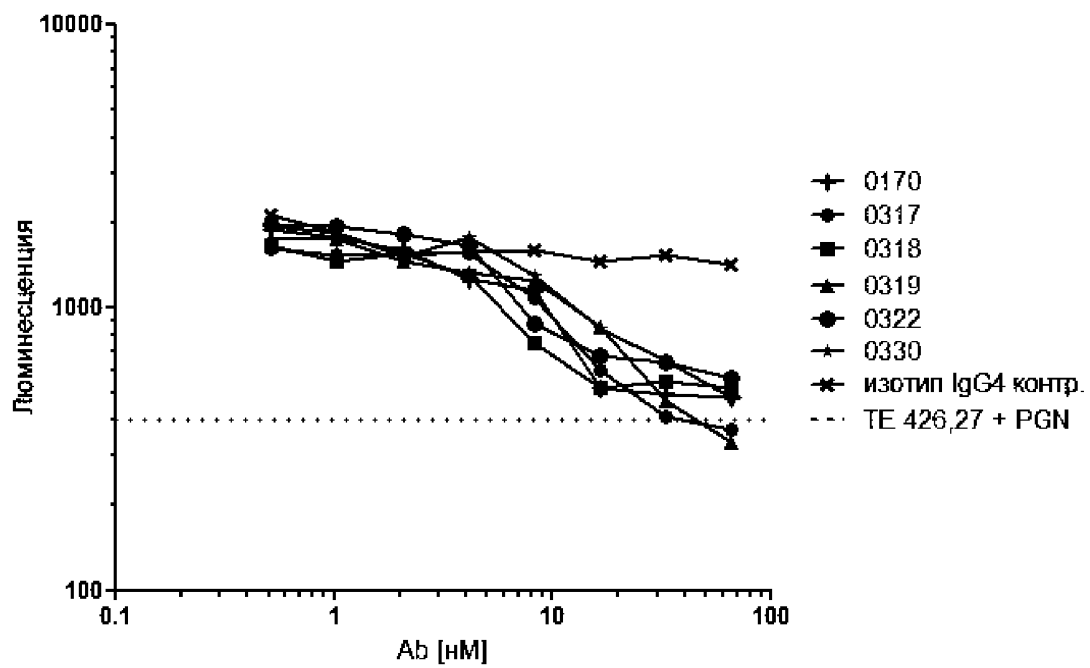
mAb ID	IC50 (нМ)
0170	0.24
0317	0.21
0318	0.47
0319	0.23
0320	0.39
0321	0.20
0322	0.26
0323	0.35
0324	0.41
0325	0.31
0326	0.36
0330	0.24
0332	0.32
0333	0.33

Фигура 2А



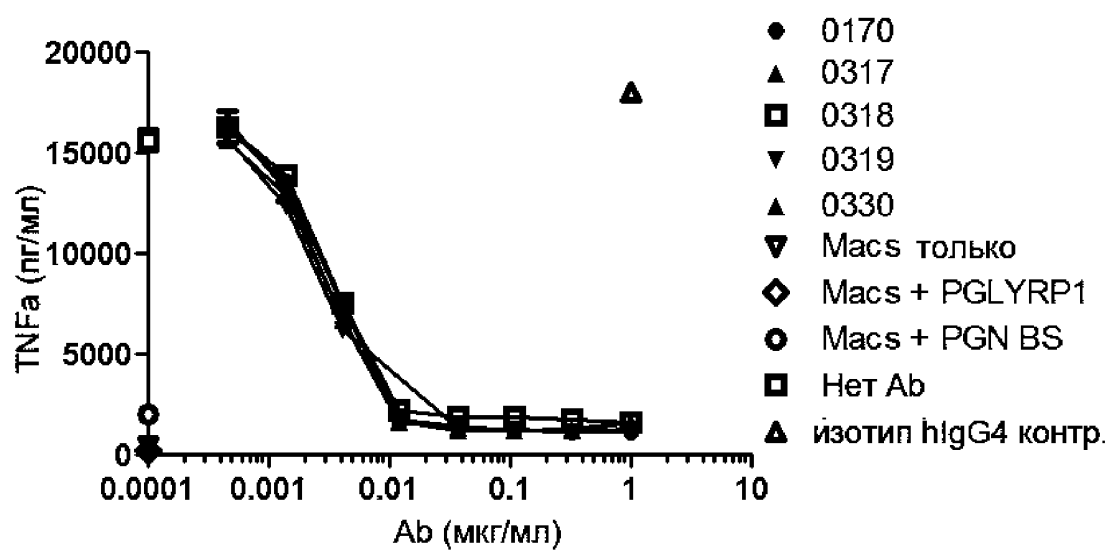
SEQ. ID. NO	IC50 (нМ)
0170	0.24
0317	0.33
0318	0.49
0319	0.27
0320	0.32
0321	0.19
0322	0.26
0323	0.34
0324	0.37
0325	0.31
0326	0.31
0330	0.22

Фигура 2В

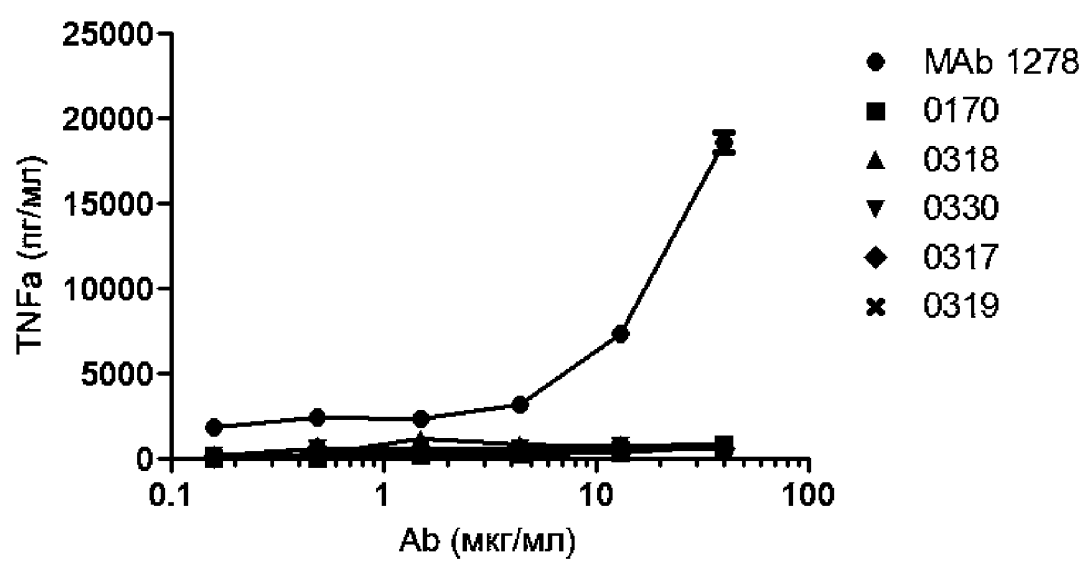


SEQ. ID. NO	IC50 (нМ)
0170	6.0
0317	9.5
0318	5.6
0319	17.7
0322	5.9
0330	10.7

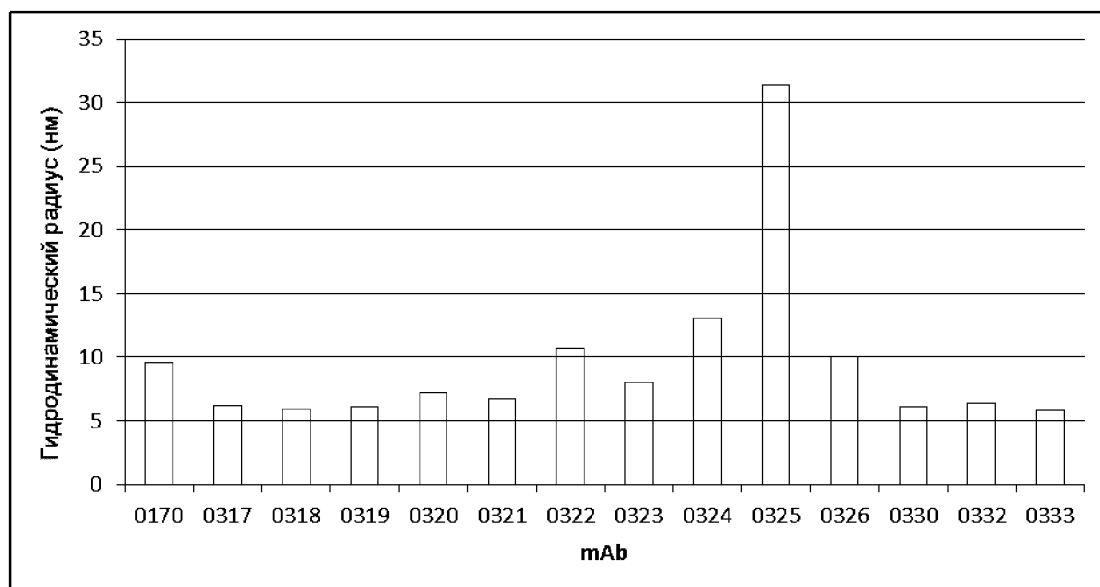
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6