

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390159 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.21

(51) Int. Cl. C07K 14/54 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.25

(54) МУТЕИНЫ IL-10 И СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ИХ ОСНОВЕ

(31) 63/045,041; 63/199,218

(32) 2020.06.26; 2020.12.14

(33) US

(86) PCT/US2021/039191

(87) WO 2021/263167 2021.12.30

(88) 2022.04.21

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Хсу Хайлин, Фолтц Ян, Мок Марисса,
Луна Виктор Митч, Чжан Мин,
Ваннберг Шарон, Джамдере Тапия
Гамзе Озлем, Райли Тимоти П. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится в целом к мутеинам IL-10, которые являются стабильными в виде мономеров, антигенсвязывающим белкам, которые связываются с TREM-1, и антигенсвязывающим белкам, содержащим мутеины IL-10 и антигенсвязывающие фрагменты, например антитела к TREM-1, и композициям на их основе. Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения воспалительного заболевания, такого как воспалительное заболевание кишечника или язвенный колит, с применением указанных композиций.

A1

202390159

202390159

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576877EA/022

МУТЕИНЫ IL-10 И СЛИТЫЕ БЕЛКИ НА ИХ ОСНОВЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 63/045041, поданной 26 июня 2020 года, и предварительной заявки на патент США № 63/199218, поданной 14 декабря 2020 года, включенных в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к мутеинам интерлейкина-10 и антигенсвязывающим белкам, содержащим IL-10 и антигенсвязывающие фрагменты, такие как антитела к TREM-1 или к PD-1, для лечения воспалительных состояний, таких как воспалительное заболевание кишечника.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Перечень последовательностей, который представляет собой часть настоящего изобретения, подается одновременно с описанием в виде текстового файла. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, который был создан 22 июня 2021 года и размер которого составляет 5726194 байта, представляет собой "55384_Seqlisting.txt". Содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Интерлейкин-10 (IL-10) представляет собой важный цитокин, который участвует в ряде процессов иммунорегуляции (см. Ouyang and O'Garra, Immunity, 50(4):871-891 2019). В частности, он характеризуется либо иммуносупрессивными, либо иммуностимулирующими эффектами в зависимости от типа клеток иммунной системы. IL-10 подавляет положительную регуляцию воспалительных цитокинов, МНСII, CD86 и ICAM в моноцитах и тканевых макрофагах. Также сообщается, что IL-10 усиливает подавляющую активность Трег-клеток. Однако IL-10 также стимулирует активацию CD8+ Т-клеток и активацию В-клеток. Существует четкая генетическая связь IL-10 с воспалительным заболеванием кишечника (IBD). У пациентов с гомозиготными мутациями с потерей функции IL-10, IL-10R1 или IL-10R2 развивалась тяжелая младенческая форма IBD (Kotlarz, Gastroenterology, 2012; Glocker, NEM, 2009). Также сообщается, что rs3024505 IL10 ассоциирован с IBD в GWAS при RAF 0,16 или 1,46, р-значении 10^{-42} (Jostins L, 2012). Пэгилированный IL-10 демонстрировал незначительную эффективность в ходе исследования болезни Крона, вероятно, по причине дозолимитирующей токсичности (Schreiber et al., Gastroenterology 119:1461, 2000). Предыдущее исследование с использованием мышей с нокаутом IL-10R1 в миелоидных клетках показало, что противовоспалительная активность IL-10 в отношении миелоидных клеток важна для контроля развития колита (Zigmond et al., Immunity, 40(5):720-33, 2014).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение предусматривает мутеины IL-10, которые являются стабильными в виде мономеров и применимыми в лечении воспалительных заболеваний. Предусматривается, что мутеины IL-10 обеспечивают сохранение/восстановление подавляющей активности IL-10 в отношении моноцитов и макрофагов, а также снижение степени обусловленной IL-10 стимуляции CD8⁺ Т-клеток и В-клеток. Настоящее изобретение также предусматривает антитела к TREM-1, которые являются применимыми в лечении воспалительных заболеваний. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие белки, содержащие мутеины IL-10 и антигенсвязывающие фрагменты, такие как антитела к TREM-1 или к PD-1, применимые для лечения воспалительных заболеваний.

[0006] В данном документе предусмотрен мутеин человеческого интерлейкина-10 (IL-10), содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, где указанный мутеин IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей AB, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали A, спирали B, спирали C, спирали D, спирали E и/или спирали F. В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 по настоящему изобретению предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали A, спирали F или петле спиралей AB. В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность мутеина IL-10 на 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2.

[0007] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 предусматривает мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, или N160 в SEQ ID NO: 2 и/или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления мутация представляет собой R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, или I87A в SEQ ID NO: 2, необязательно содержащей добавление 6 аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления мутация представляет собой N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ ID NO: 2, необязательно содержащей добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных

вариантах осуществления мутеин IL-10 охватывает комбинации мутаций IL-10, которые изложены в таблице 16, или таблице 17, или таблице 21, и раскрытии в данном документе. В различных вариантах осуществления аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676). В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность определенных мутеинов IL-10 изложена под SEQ ID NO: 3-10 и SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2540, и 2777-2791.

[0008] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен мутеин человеческого интерлейкина-10 (IL-10), содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3-10 или SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, или 2540 и 2777-2791. В различных вариантах осуществления мутеин содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательностям мутеина, описанным в данном документе.

[0009] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 обеспечивает снижение степени подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8⁺ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 дикого типа (wt). В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках при одновременном снижении степени активации CD8⁺ Т-клеток и В-клеток.

[0010] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 слит со связывающим фрагментом, который нацеливает антигенсвязывающий белок на миелоидные клетки, В-клетки или Т-клетки. В различных вариантах осуществления связывающий белок

связывается с белком клеточной поверхности на миелоидной клетке, CD8+ Т-клетке, CD4+ Т-клетке или В-клетке.

[0011] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 дополнительно содержит фрагмент, увеличивающий период полужизни. В различных вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой Fc-домен. В различных вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль (PEG) или т. п.

[0012] В различных вариантах осуществления мутеин представляет собой димер. В различных вариантах осуществления димер мутеина содержит два разных мономера мутеина. В различных вариантах осуществления димер мутеина содержит одинаковые мономеры мутеина.

[0013] Дополнительно предусмотрена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует мутеин IL-10, описанный в данном документе. В различных вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность мутеинов IL-10 изложена под SEQ ID NO: 11-18.

[0014] Настоящее изобретение также предусматривает вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует мутеин IL-10, функционально связанный с последовательностью для контроля экспрессии.

[0015] В данном документе предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует мутеин IL-10. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO. Также предусмотрены способ применения клетки-хозяина для получения мутеина IL-10, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение мутеина IL-10, и мутеин IL-10, полученный указанным способом.

[0016] В настоящем изобретении также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая мутеин IL-10, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Предусматривается, что фармацевтическая композиция может представлять собой стерильную фармацевтическую композицию.

[0017] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

- а. представляет собой антитело или фрагмент антитела;
- б. связывается с человеческим триггерным рецептором 1, экспрессируемым на миелоидных клетках (TREM-1), имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;
- с. содержит переменный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0018] В различных вариантах осуществления

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 110, 150, 170 или 290;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 111, 151, 171 или 291;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 32, 52, 72, 112, 152, 172 или 292;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 116, 156, 176 или 296;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 117, 157, 177 или 297; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 118, 158, 178 или 298.

[0019] В различных вариантах осуществления

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 50 или 110;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 51 или 111;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 52 или 112;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 56 или 116;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 57 или 117; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 58 или 118.

[0020] Также предусмотрены консенсусные последовательности CDR и/или последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей антитела к TREM-1, раскрытые в данном документе. Например, в различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR1, выбранную из группы, состоящей из

$X_1ASQSX_2X_3X_4NLA$ (SEQ ID NO: 2199), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой V или I, где X_3 представляет собой N или S, и где X_4 представляет собой S, H, I, V или A;

$QASX_1DIX_2X_3X_4LN$ (SEQ ID NO: 2204), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой R, S, N или F, где X_3 представляет собой K или N, и где X_4 представляет собой H, Y или D;

RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2212);

QASQDIRKHLN (SEQ ID NO: 2213);

RASQDISSNLA (SEQ ID NO: 2214);

QASQDIHLN (SEQ ID NO: 2215);

RASQGIRKWLA (SEQ ID NO: 2216)

RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2217) и

SGDKLGERVS (SEQ ID NO: 2218).

[0021] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR2, выбранную из группы, состоящей из

GAX_1X_2RAT (SEQ ID NO: 2200), где X_1 представляет собой S или Y, и где X_2 представляет собой T или I;

$X_1X_2X_3X_4LET$ (SEQ ID NO: 2206), где X_1 представляет собой D, G или H, где X_2 представляет собой A, V или T, где X_3 представляет собой S, A или Y, и где X_4 представляет собой T или N;

GASTRAT (SEQ ID NO: 2219);

DASNLET (SEQ ID NO: 2220) и

AASRLQS (SEQ ID NO: 2221).

[0022] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR3, выбранную из группы, состоящей из

$QX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7T$ (SEQ ID NO: 2201); где X_1 представляет собой Q, H или E, где X_2 представляет собой F или Y, где X_3 представляет собой K, Y или I, где X_4 представляет собой N, T, L, I или M; где X_5 представляет собой W, F, H или Y, где X_6 отсутствует или представляет собой P; где X_7 представляет собой W, N, Y, H или L;

QX₁YX₃X₄X₅PX₆T (SEQ ID NO: 2207), где X₁ представляет собой Q или H, где X₂ представляет собой D, A или G, где X₃ представляет собой N или K; где X₄ представляет собой L или I, и где X₅ представляет собой I или L;

QQFKNWPPT (SEQ ID NO: 2222);

QHYNLNPIT (SEQ ID NO: 2223);

LQANGFPWT (SEQ ID NO: 2224);

QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 2225) и

QFWPPWT (SEQ ID NO: 2226).

[0023] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR1, выбранную из группы, состоящей из

X₁X₂X₃MX₄ (SEQ ID NO: 2202), где X₁ представляет собой A, R, T или S, где X₂ представляет собой Y или N, где X₃ представляет собой A или W, и где X₄ представляет собой S или N;

X₁YDIN (SEQ ID NO: 2208), где X₁ представляет собой R или S; GYYX₁H (SEQ ID NO: 2723), где X₁ представляет собой M или I;

AYAMS (SEQ ID NO: 2227);

RYDIN (SEQ ID NO: 2228); и

SYWMS (SEQ ID NO: 2229).

[0024] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR2, выбранную из группы, состоящей из

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉YYX₁₀X₁₁X₁₂VKG (SEQ ID NO: 2205), где X₁ представляет собой T, E или S, где X₂ отсутствует или представляет собой M, V или I, где X₃ представляет собой S, R или K, где X₄ представляет собой G или Q, где X₅ представляет собой S, D или H, где X₆ представляет собой G, S, L или A, где X₇ представляет собой S, G или R, где X₈ представляет собой T, S, P или E, где X₉ представляет собой T или I, где X₁₀ представляет собой A или V, где X₁₁ представляет собой D или E, и где X₁₂ представляет собой S или A;

X₁X₂NPX₃X₄GX₅X₆GX₇X₈X₉X₁₀FX₁₁X₁₂ (SEQ ID NO: 2209), где X₁ представляет собой W или R, где X₂ представляет собой M или L, где X₃ представляет собой N, Q или K, где X₄ представляет собой S, A или R, где X₅ представляет собой N или Q, где X₆ представляет собой S, A или T, где X₇ представляет собой S, Q или Y, где X₈ представляет собой V или T, где X₉ представляет собой Q или K, где X₁₀ представляет собой K или N, где X₁₁ представляет собой R или Q, и где X₁₂ представляет собой G или D;

TSGSGSTTYADSVKG (SEQ ID NO: 2230);

WMNPNSGNSSVQKFRG (SEQ ID NO: 2231);

NIKQDGSEYYVDSVKG (SEQ ID NO: 2232); и

TSGSGTTYADSVKG (SEQ ID NO: 2669).

[0025] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR3, выбранную из группы, состоящей из

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7FX_8YYX_9$ (SEQ ID NO: 2203), где X_1 представляет собой V, E, A или G, где X_2 представляет собой A, F, Y или G, где X_3 представляет собой G, S, Y или W, где X_4 представляет собой S или R, где X_5 отсутствует или представляет собой N, где X_6 представляет собой F, S, Y или отсутствует, где X_7 представляет собой L или F или отсутствует, где X_8 представляет собой D или E, и где X_9 представляет собой Y, H или S;

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}FX_{13}X_{14}$ (SEQ ID NO: 2210); где X_1 представляет собой G, L или R, где X_2 представляет собой G, I или R, где X_3 представляет собой Y, R, I, G или A, где X_4 представляет собой T, S, Y или V, где X_5 представляет собой S или Y, где X_6 представляет собой S, A, I или R, где X_7 представляет собой W, A или S, где X_8 отсутствует или представляет собой S, где X_9 отсутствует или представляет собой F, W или Y, где X_{10} представляет собой R, S, H, K или E, где X_{11} представляет собой W, H, Y или F, где X_{12} представляет собой Y, V, A или S, где X_{13} представляет собой D или Q, и где X_{14} представляет собой L, Y, I или H;

VAGSNFLFDY (SEQ ID NO: 2670);

GGYTSSWRWYFDL (SEQ ID NO: 2671);

GGYTSSWSRWYFDL (SEQ ID NO: 2672); и

DYGDSFDY (SEQ ID NO: 2673).

[0026] В различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрен выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

c. содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1ASQSX_2X_3X_4NLA$ (SEQ ID NO: 2199), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой V или I, где X_3 представляет собой N или S, и где X_4 представляет собой S, H, I, V или A;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GAX_1X_2RAT (SEQ ID NO: 2200), где X_1 представляет собой S или Y, и где X_2 представляет собой T или I; и

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $QX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7T$ (SEQ ID NO: 2201); где X_1 представляет собой Q, H или E, где X_2 представляет собой F или Y, где X_3 представляет собой K, Y или I, где X_4 представляет собой N, T, L, I или M; где X_5 представляет собой W, F, H или Y, где X_6 отсутствует или представляет собой P; где X_7 представляет собой W, N, Y, H или L; и

d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3MX_4$ (SEQ ID NO: 2202), где X_1 представляет собой A, R, T или S, где X_2 представляет собой Y или N, где X_3 представляет собой A или W, и где X_4 представляет собой S или N;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YYX_{10}X_{11}X_{12}VKG$ (SEQ ID NO: 2205), где X_1 представляет собой T, E или S, где X_2 отсутствует или представляет собой M, V или I, где X_3 представляет собой S, R или K, где X_4 представляет собой G или Q, где X_5 представляет собой S, D или H, где X_6 представляет собой G, S, L или A, где X_7 представляет собой S, G или R, где X_8 представляет собой T, S, P или E, где X_9 представляет собой T или I, где X_{10} представляет собой A или V, где X_{11} представляет собой D или E, и где X_{12} представляет собой S или A;
и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7FX_8YYX_9$ (SEQ ID NO: 2203), где X_1 представляет собой V, E, A или G, где X_2 представляет собой A, F, Y или G, где X_3 представляет собой G, S, Y или W, где X_4 представляет собой S или R, где X_5 отсутствует или представляет собой N, где X_6 представляет собой F, S, Y или отсутствует, где X_7 представляет собой L или F или отсутствует, где X_8 представляет собой D или E, и где X_9 представляет собой Y, N или S.

[0027] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2212);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 2219);

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QQFKNWPPT (SEQ ID NO: 2222); и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AYAMS (SEQ ID NO: 2227);

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность TSGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2230); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VAGSNFLFDY (SEQ ID NO: 2670).

[0028] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

с. содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASX₁DIX₂X₃X₄LN (SEQ ID NO: 2204), где X₁ представляет собой R или Q, где X₂ представляет собой R, S, N или F, где X₃ представляет собой K или N, и где X₄ представляет собой H, Y или D;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄LET (SEQ ID NO: 2206), где X₁ представляет собой D, G или H, где X₂ представляет собой A, V или T, где X₃ представляет собой S, A или Y, и где X₄ представляет собой T или N;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QX₁YX₃X₄X₅PX₆T (SEQ ID NO: 2207), где X₁ представляет собой Q или H, где X₂ представляет собой D, A или G, где X₃ представляет собой N или K; где X₄ представляет собой L или I, и где X₅ представляет собой I или L; и

d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁YDIN (SEQ ID NO: 2208), где X₁ представляет собой R или S;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂NPX₃X₄GX₅X₆GX₇X₈X₉X₁₀FX₁₁X₁₂ (SEQ ID NO: 2209), где X₁ представляет собой W или R, где X₂ представляет собой M или L, где X₃ представляет собой N, Q или K, где X₄ представляет собой S, A или R, где X₅ представляет собой N или Q, где X₆ представляет собой S, A или T, где X₇ представляет собой S, Q или Y, где X₈ представляет собой V или T, где X₉ представляет собой Q или K, где X₁₀ представляет собой K или N, где X₁₁ представляет собой R или Q, и где X₁₂ представляет собой G или D; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂FX₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 2210); где X₁ представляет собой G, L или R, где X₂ представляет собой G, I или R, где X₃ представляет собой Y, R, I, G или A, где X₄ представляет собой T, S, Y или V, где X₅ представляет собой S или Y, где X₆ представляет собой S, A, I или R, где X₇ представляет собой W, A или S, где X₈ отсутствует или представляет собой S, где X₉ отсутствует или представляет собой F, W или Y, и где X₁₀ представляет собой R, S, H, K или E, где X₁₁ представляет собой W, H, Y или F, где X₁₂ представляет собой Y, V, A или S, где X₁₃ представляет собой D или Q, и где X₁₄ представляет собой L, Y, I или H.

[0029] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASQDIRKHLN (SEQ ID NO: 2213);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DASNLET (SEQ ID NO: 2220); и

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYDNLPIIT (SEQ ID NO: 2223); и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RYDIN (SEQ ID NO: 2228);

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность WMNPNSGNSSVQKFRG (SEQ ID NO: 2231); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GGYTSSWRWYFDL (SEQ ID NO: 2671) или GGYTSSWSRWYFDL (SEQ ID NO: 2672).

[0030] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим триггерным рецептором 1, экспрессируемым на миелоидных клетках (TREM-1), имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

c. содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); или

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0031] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3); или

vii) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3).

[0032] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3); или SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3).

[0033] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

а. переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279 299 и 2183; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

[0034] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300.

[0035] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

a. варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 121;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119; и

b. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 62 и 122;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120.

[0036] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

i) варибельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 41, и варибельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 42;

ii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 62;

iii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 82;

iv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 101, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 102;

v) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 122;

vi) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 162;

vii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 182;

viii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 201, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 202;

x) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 221, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 222;

xi) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 241, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 242;

xii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 261, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 262;

xiii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 281, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 282;

xiv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 302; или

xv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 2185, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 2186.

[0037] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

i) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 41, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 42;

ii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 62;

iii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 82;

iv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 122;

v) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 162;

vi) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 182; или

vii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 302.

[0038] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 62; или переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 122.

[0039] В различных вариантах осуществления аминокислотные последовательности могут быть на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186, а также SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0040] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, описанной под SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0041] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301.

[0042] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 62 и 122. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 121.

[0043] В различных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот каркаса тяжелой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности человеческого

антитела. В различных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот каркаса легкой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности человеческого антитела.

[0044] В некоторых случаях последовательность, раскрытая в данном документе, может содержать N-концевую сигнальную последовательность, применимую для рекомбинантного получения. В данном документе предусмотрены последовательности антител или антигенсвязывающих белков, связывающих TREM-1, в которых отсутствуют сигнальные последовательности. Иллюстративные сигнальные последовательности включают MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 2674); MAWALLLTLLTQGTGSWASYEL (SEQ ID NO: 2675) и нуклеиновые кислоты, кодирующие такие сигнальные последовательности.

[0045] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, дополнительно содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области легкой цепи.

[0046] В различных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи выбрана из константных областей тяжелой цепи IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагментов, их комбинаций и их модификаций, где от одной до десяти аминокислот каркаса тяжелой цепи замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека.

[0047] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, описанный в данном документе, ингибирует связывание лиганда TREM-1 с TREM-1.

[0048] Также предусмотрен антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с человеческим белком TREM-1, имеющим последовательность под SEQ ID NO: 20, с антигенсвязывающим белком, связывающим TREM-1, описанным в данном документе.

[0049] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, Fab, F(ab')₂, Fab₂, моновалентного IgG, scFv, scFv-Fc, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, представляет собой антитело IgG1. В различных вариантах осуществления антитело IgG1 представляет собой антитело IgG1z или IgG1z-SEFL2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой моновалентный IgG.

[0050] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой человеческое антитело.

[0051] Также предусмотрена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, описанного в данном документе, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, описанного в данном документе, и выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь и легкую цепь антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, описанного в данном документе.

[0052] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, и 300, и 2184. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279 299 и 2183.

[0053] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299.

[0054] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную полинуклеотидной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119.

[0055] Дополнительно предусмотрен вектор экспрессии, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, описанного в данном документе, функционально связанный с последовательностью для контроля экспрессии.

[0056] Настоящее изобретение предусматривает рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антигенсвязывающего белка или антитела, связывающих TREM-1, описанных в данном документе; или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела к TREM-1, описанного в

данном документе; или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь антитела к TREM-1, описанного в данном документе; или вектор, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь антитела к TREM-1, описанного в данном документе. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[0057] Дополнительно предусмотрены способ применения клетки-хозяина для получения антигенсвязывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение указанного антигенсвязывающего белка, и антигенсвязывающий белок, полученный указанным способом.

[0058] Также предусмотрена стерильная фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0059] Дополнительно предусмотрен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где

- a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела,
- b. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным,
- c. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2, и
- d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом.

[0060] В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с С-концом антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с N-концом антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с N- и С-концами антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления фрагмент IL-10 слит во внутреннем сайте в антигенсвязывающем фрагменте. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с тяжелой и/или легкой цепью антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления тяжелая цепь и/или легкая цепь представляет собой модифицированную или сконструированную тяжелую цепь или легкую цепь.

[0061] Также предусмотрен антигенсвязывающий белок, содержащий

- (a) полипептидную последовательность, имеющую формулу A-L-M или M-L-A, где
 - i) A представляет собой тяжелую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,
 - ii) L представляет собой линкерный пептид, содержащий от 4 до 20 аминокислот, и

iii) М представляет собой мутеин IL-10, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с IL-10 wt, изложенным под SEQ ID NO: 2, и

(b) легкую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,

где тяжелая цепь иммуноглобулина из (a) и легкая цепь иммуноглобулина из (b) образуют фрагмент антитела IgG, который связывает TREM-1, где белок содержит одну или две молекулы полипептида из (a) и одну или две молекулы легкой цепи из (b), где необязательно только 1 полипептид из (a) содержит фрагмент М.

[0062] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок снижает степень подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8+ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt.

[0063] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка

a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, и

b. фрагмент IL-10 слит с каждой тяжелой цепью антитела.

[0064] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка каждый фрагмент IL-10 представляет собой мономер. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит два разных мономера мутеина. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит два одинаковых мономера мутеина.

[0065] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка каждый фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей AB, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали A, спирали B, спирали C, спирали D, спирали E и/или спирали F.

[0066] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали A. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали F. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в петле спиралей AB.

[0067] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10 не характеризуется стимуляцией CD8+ Т-клеток и/или стимуляцией В-клеток у субъекта-человека, например, по сравнению с IL-10 wt.

[0068] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 снижает степень подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8+ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt.

[0069] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10, например антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-

1/мутеина IL-10, подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10, например антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10, подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках, однако по-прежнему не характеризуется активацией CD8⁺ Т-клеток и В-клеток.

[0070] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, где мутеин IL-10 слит с антигенсвязывающим партнером, нацеленным на белки клеточной поверхности на CD8⁺ клетках и/или В-клетках, повышает уровни стимуляции CD8⁺ Т-клеток и/или уровни стимуляции В-клеток у субъекта-человека.

[0071] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, N160 в SEQ ID NO: 2 и/или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0072] В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D или I87A в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0073] В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D или I87A в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676). В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ

ID NO: 2,, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676).

[0074] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка каждый мутеин IL-10 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность мутеина IL-10 изложена под SEQ ID NO: 3-10. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность мутеина IL-10 изложена под SEQ ID NO: 3-10 и SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540 и 2777-2791.

[0075] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере один линкер, слитый с по меньшей мере одним С-концом антигенсвязывающего фрагмента, и фрагмент IL-10 ковалентно связан с С-концом каждого линкера. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет 4-18 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет шесть аминокислот. В различных вариантах осуществления линкер представляет собой 3-мерный, 4-мерный, 5-мерный, 6-мерный, 7-мерный или 8-мерный пептид. В различных вариантах осуществления линкер содержит остатки GS.

[0076] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит "погруженный" мутеин IL-10. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит (a) Fab-часть фрагмента, связывающего TREM-1, (b) по меньшей мере один линкер G4, слитый с С-концом Fab-части фрагмента, связывающего TREM-1, (c) фрагмент IL-10, ковалентно связанный с С-концом каждого линкера; другой линкер G4, слитый с С-концом фрагмента IL-10; Fc-область, ковалентно присоединенную к С-концу данного второго линкера G4. Предусмотренные дополнительные линкеры описаны далее в разделе "Подробное описание".

[0077] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент в антигенсвязывающем белке дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области тяжелой цепи из части антигенсвязывающего белка, представляющей собой антитело. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области легкой цепи из части антигенсвязывающего белка, представляющей собой антитело.

[0078] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, Fab, F(ab')₂, Fab₂, моновалентного IgG, scFv, scFv-Fc, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антитело представляет собой антитело IgG1z или IgG1z-SEFL2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моновалентный IgG. В различных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента выбрана из константных областей тяжелой цепи IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагментов, их комбинаций и их модификаций, где от одной до десяти аминокислот каркаса тяжелой цепи замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой константной области антитела человека.

[0079] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент связывается с PD-1 человека, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим TREM-1 с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-8} М. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывает свой антиген с аффинностью связывания, составляющей от по меньшей мере 10^{-8} М до 10^{-15} М, или от 10^{-8} М до 10^{-12} М, или 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М или 10^{-15} М.

[0080] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. переменный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191;

iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

b. содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0081] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

a. последовательность CDR1 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 110, 150, 170 или 290;

b. последовательность CDR2 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 111, 151, 171 или 291;

c. последовательность CDR3 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 32, 52, 72, 112, 152, 172 или 292;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 116, 156, 176 или 296;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 117, 157, 177 или 297; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 118, 158, 178 или 298.

[0082] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

a. последовательность CDR1 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 50 или 110;

b. последовательность CDR2 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 51 или 111;

c. последовательность CDR3 легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 52 или 112;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 56 или 116;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 57 или 117; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 58 или 118.

[0083] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); и

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0084] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3); и

vii) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3).

[0085] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3); и SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3).

[0086] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности,

выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 300 и 2184.

[0087] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

а. вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299; и

б. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300.

[0088] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 121;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 62 и 122;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120.

[0089] В различных вариантах осуществления аминокислотные последовательности могут быть на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185 и SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0090] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0091] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0092] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

i) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 41, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 42;

ii) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62;

iii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 82;

iv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 101, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 102;

v) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 122;

vi) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 141, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 142;

vii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 162;

viii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 182;

ix) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 201, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 202;

x) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 221, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 222;

xi) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 241, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 242;

xii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 261, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 262;

xiii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 281, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 282;

xiv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 302; или

xv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 2185, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 2186.

[0093] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

i) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 41, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 42;

ii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 62;

iii) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 82;

iv) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 122;

v) переменный домен легкой цепи, описанный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, описанный под SEQ ID NO: 162;

vi) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 181, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 182; или

vii) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 301, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 302.

[0094] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62; или вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 121, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 122.

[0095] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0096] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605.

[0097] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

[0098] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035,

1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085.

[0099] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007.

[0100] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135.

[0101] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2726-2776.

[0102] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0103] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925,

1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, и 2605.

[0104] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий белок, связывающие TREM-1, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

[0105] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит пары тяжелых и легких цепей, которые изложены в таблице 10, таблице 11, таблице 13А или таблице 13В, или используют антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи, изложенный в таблице 16, таблице 17 или таблице 22.

[0106] Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие определенные тяжелые и легкие цепи антигенсвязывающего белка, изложены под SEQ ID NO: 303-526 (бивалентные) и SEQ ID NO: 527-862 (моновалентные). Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариантные вариабельные области тяжелой цепи антитела к TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 1884, 1886, 1888, 1890, 1892, 1894, 1896, 1898, 1900, 1902, 1904, 1906, 1908, 1910, 1912, 1914, 1916, 1918, 1920, 1922, 1924, 1926, 1928, 1930, 1932, 1934, 1936, 1938, 1940, 1942, 1944, 1946, 1948, 1950, 1952, 1954, 1956, 1958, 1960, 1962, 1964, 1966, 1968, 1970, 1972, 1974, 1976, 1978, 1980, 1982, 1984, 1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, и 2008, и также изложены под SEQ ID NO: 2012, 2014, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052, 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086, 2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120, 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, и 2136; и нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантные

вариабельные области легкой цепи антитела к TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, и также изложены под SEQ ID NO: 2234, 2236, 2238, 2240, 2242, 2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256, 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290, 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324, 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, и 2358.

[0107] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающих белков одна или несколько аминокислот каркаса тяжелой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека. В различных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот каркаса легкой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности человеческого антитела.

[0108] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, дополнительно содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области легкой цепи.

[0109] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085; и каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048,

1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0110] В различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены варианты вариабельных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к TREM-1. Вариантные последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, 2007, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, 2135, 2726-2776 и в таблице 10, таблице 11, таблице 13А, таблице 13В и таблице 22.

[0111] Вариантные последовательности вариабельной области легкой цепи антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, 2357, в таблице 10 и таблице 11. Предусматривается, что антигенсвязывающий белок TREM-1-IL-10 содержит вариантную последовательность тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к TREM-1, раскрытую в данном документе.

[0112] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок может быть моновалентным. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1087, 1090, 1093, 1096, 1105, 1108, 1111, 1114, 1117, 1123, 1126, 1129, 1132, 1138, 1141, 1147, 1150, 1153, 1156, 1159, 1162, 1165, 1168, 1171, 1174, 1177, 1180, 1183, 1186, 1189, 1192, 1195, 1198, 1201, 1204, 1207, 1210, 1213, 1216, 1219, 1222, 1225, 1228, 1231, 1237, 1240, 1243, 1246, 1252, 1255, 1258, 1261, 1264, 1267, 1270, 1273, 1276, 1279, 1285, 1288, 1294, 1297, 1300, 1303, 1309, 1312, 1315, 1318, 1321, 1324, 1333, 1336, 1342, 1345, 1348, 1351, 1354, 1357, 1360, 1363, 1366, 1369, 1372, 1375, 1378, 1381, 1384, 1387, 1390, 1393, 1396, 1399, 1402, 1408, 1411, 1414, 1417, и 1420. В различных вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%

идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1088, 1091, 1094, 1097, 1106, 1109, 1112, 1115, 1118, 1124, 1127, 1130, 1133, 1139, 1142, 1148, 1151, 1154, 1157, 1160, 1163, 1166, 1169, 1172, 1175, 1178, 1181, 1184, 1187, 1190, 1193, 1196, 1199, 1202, 1205, 1208, 1211, 1214, 1217, 1220, 1223, 1226, 1229, 1232, 1238, 1241, 1244, 1247, 1253, 1256, 1259, 1262, 1265, 1268, 1271, 1274, 1277, 1280, 1286, 1289, 1295, 1298, 1301, 1304, 1310, 1313, 1316, 1319, 1322, 1325, 1334, 1337, 1343, 1346, 1349, 1352, 1355, 1358, 1361, 1364, 1367, 1370, 1373, 1376, 1379, 1382, 1385, 1388, 1391, 1394, 1397, 1400, 1403, 1409, 1412, 1415, 1418 и 1421. В различных вариантах осуществления моновалентный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит Fc-область, например, изложенную под SEQ ID NO: 1089, 1092, 1095, 1098, 1107, 1110, 1113, 1116, 1119, 1125, 1128, 1131, 1134, 1140, 1143, 1149, 1152, 1155, 1158, 1161, 1164, 1167, 1170, 1173, 1176, 1179, 1182, 1185, 1188, 1191, 1194, 1197, 1200, 1203, 1206, 1209, 1212, 1215, 1218, 1221, 1224, 1227, 1230, 1233, 1239, 1242, 1245, 1248, 1254, 1257, 1260, 1263, 1266, 1269, 1272, 1275, 1278, 1281, 1287, 1290, 1296, 1299, 1302, 1305, 1311, 1314, 1317, 1320, 1323, 1326, 1335, 1338, 1344, 1347, 1350, 1353, 1356, 1359, 1362, 1365, 1368, 1371, 1374, 1377, 1380, 1383, 1386, 1389, 1392, 1395, 1398, 1401, 1404, 1410, 1413, 1416, 1419 и 1422. Моновалентные антигенсвязывающие белки и Fc-область можно собирать или сочетать, как изложено в таблице 13В.

[0113] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит одну или две легкие цепи и одну или две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2137, 2139, 2141, 2143, 2145, 2147, 2149, 2151, 2153, 2155, 2157, 2159, 2161, 2163, 2165, 2167, 2169, 2171, 2173, 2175, 2177, 2179, 2181, 2359, 2361, 2363, 2365, 2367, 2369, 2371, 2373, 2375, 2377, 2379, 2381, 2383, 2385, 2387, 2389, 2391, 2393, 2395, 2397, 2399, 2401, 2403, 2405, 2407, 2409, 2411, 2143, 2415, 2417, 2419, 2421, 2423, 2425, 2427, 2429, 2431, 2433, 2435, 2437, 2439, 2441, 2443, 2445, 2447, 2449, 2451, 2453, 2455, 2457, 2459, 2461, 2463, 2465, 2467, 2469, 2471, 2473, 2475, 2477, 2479, 2481, 2483, 2485, 2487, 2489, 2491, 2493, 2495, 2497, 2498, 2499, 2501, 2503, 2505, 2507, 2509, 2511, 2513, 2515, 2517, 2519, 2521, 2523, 2525, 2527, 2529, 2531, 2533, 2535, 2537, 2539, и 2726-2776, и изложенной в таблице 16, или таблице 17, или таблице 21, или таблице 22.

[0114] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2137, 2139, 2141, 2143, 2145, 2147, 2149, 2151, 2153, 2155, 2157, 2159, 2161, 2163, 2165, 2167, 2169, 2171, 2173, 2175, 2177, 2179, 2181, 2359, 2361, 2363, 2365, 2367, 2369, 2371, 2373, 2375, 2377, 2379, 2381, 2383, 2385, 2387, 2389, 2391, 2393, 2395, 2397, 2399, 2401, 2403, 2405, 2407, 2409, 2411, 2143, 2415, 2417, 2419, 2421, 2423, 2425, 2427, 2429, 2431, 2433, 2435, 2437, 2439, 2441, 2443, 2445, 2447, 2449, 2451, 2453, 2455, 2457, 2459, 2461, 2463, 2465,

2467, 2469, 2471, 2473, 2475, 2477, 2479, 2481, 2483, 2485, 2487, 2489, 2491, 2493, 2495, 2497, 2498, 2499, 2501, 2503, 2505, 2507, 2509, 2511, 2513, 2515, 2517, 2519, 2521, 2523, 2525, 2527, 2529, 2531, 2533, 2535, 2537, и 2539. В различных вариантах осуществления часть антигенсвязывающего белка, представляющая собой тяжелую цепь, образует пару с соответствующим клоном на основе легкой цепи, например, антителом 61B12 (SEQ ID NO: 105, но без сигнальной последовательности, или SEQ ID NO: 2552, легкая цепь SEFL2 TREM1_61B12.001_huIgGz, или SEQ ID NO: 1042, 1044, 1046, 1048, 1052, 1054), или как изложено под SEQ ID NO: 2233-2358, в таблице 10 или таблице 11.

[0115] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 2726-2776. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2726-2776. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2727-2732. В различных вариантах осуществления тяжелая цепь образует пару с соответствующим клоном на основе легкой цепи, например, под SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554 для клона 63F8.001 (но без сигнальной последовательности) и под SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555 для 64D7.001 (но без сигнальной последовательности). В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2727 или 2728 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554, или другую последовательность легкой цепи для клона 63F8 или 63F8.001, как описано в данном документе. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2729, 2730, 2731 или 2732 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555, или другую последовательность легкой цепи для 64D7 или 64D7.001, как описано в данном документе.

[0116] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание лиганда(-ов) TREM-1 с TREM-1.

[0117] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента мутеина IL-10, где

- a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела,
- b. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным,
- c. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2,

d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом, и

e. антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с человеческим белком TREM-1 с антигенсвязывающим фрагментом, связывающим TREM-1, описанным в данном документе.

[0118] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое антитело.

[0119] Также предусмотрена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область легкой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, и выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, и дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область легкой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе.

[0120] Настоящее изобретение предусматривает вектор или векторы экспрессии, содержащие молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, функционально связанный с последовательностью для контроля экспрессии.

[0121] Также предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, предусматривающую антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, или вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В различных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку СНО. Настоящее изобретение предусматривает способ применения клетки-хозяина, описанной в данном документе, для получения антигенсвязывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение указанного антитела, и предусматривает антигенсвязывающий белок, полученный указанным способом.

[0122] Настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая мутеин IL-10 по настоящему изобретению. Дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела к TREM-1 по настоящему изобретению. Предусматривается, что фармацевтические композиции представляют собой стерильные фармацевтические композиции.

[0123] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

мутеина IL-10, описанного в данном документе, или композиции, содержащей мутеин IL-10.

[0124] В родственном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, описанного в данном документе, или композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, описанный в данном документе. В различных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение мутеина IL-10, описанного в данном документе, в комбинации с антигенсвязывающим белком, связывающим TREM-1. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, и мутеин IL-10 вводят в одной и той же композиции или в разных композициях.

[0125] Также предусмотрен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, или композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе. В различных вариантах осуществления предусмотрен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антигенсвязывающего белка на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10, описанного в данном документе, или композиции, содержащей указанный антигенсвязывающий белок.

[0126] В различных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита или синдрома высвобождения цитокинов (CRS). В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой синдром раздраженного кишечника. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой псориаз. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой псориатический артрит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой синдром высвобождения цитокинов.

[0127] В различных вариантах осуществления лечение с помощью мутеина IL-10 снижает степень подавления выработки TNF-альфа в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8⁺ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt. В различных вариантах осуществления лечение с помощью антигенсвязывающего белка на основе мутеина IL-10, например антигенсвязывающего белка на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10, подавляет выработку TNF-α в

миелоидных клетках. В различных вариантах осуществления лечение с помощью антигенсвязывающего белка на основе мутеина IL-10, например антигенсвязывающего белка на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10, подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках, одновременно снижая активацию CD8⁺ Т-клеток и В-клеток. В различных вариантах осуществления лечение ингибирует выработку TNF- α в миелоидных клетках без стимуляции CD8⁺ Т-клеток и/или стимуляции В-клеток у субъекта. В различных вариантах осуществления лечение обеспечивает снижение уровней TNF- α у субъекта.

[0128] В различных вариантах осуществления средство для лечения вводят внутривенно или подкожно. В различных вариантах осуществления средство для лечения вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в шесть месяцев.

[0129] В различных вариантах осуществления способы включают введение одного или двух дополнительных терапевтических средств. В различных вариантах осуществления дополнительные терапевтические средства выбраны из кортикостероидов, NSAID, анальгетиков, иммуносупрессорных средств, противовоспалительных средств, ингибиторов TNF α , ингибиторов IL-12/IL-23, IL-17 и IFN- γ .

[0130] Настоящее изобретение также предусматривает композицию, содержащую мутеин IL-10, описанный в данном документе, для применения в лечении воспалительного заболевания. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение композиции, содержащей мутеин IL-10, описанный в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0131] Дополнительно предусмотрена композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, описанные в данном документе, для применения в лечении воспалительного заболевания. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение композиции, содержащей антитело к TREM-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0132] Также предусмотрена композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, описанные в данном документе, в комбинации с мутеином IL-10, описанным в данном документе, для применения в лечении воспалительного заболевания. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, описанные в данном документе, в комбинации с мутеином IL-10, описанным в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0133] Также предусмотрена композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, например антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10,

описанный в данном документе, для применения в лечении воспалительного заболевания. Дополнительно предусмотрено применение композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, например, антигенсвязывающий белок на основе антитела к TREM-1/мутеина IL-10, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0134] В различных вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит или синдром высвобождения цитокинов (CRS). В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой синдром раздраженного кишечника. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой псориаз. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой псориатический артрит. В одном варианте осуществления воспалительное заболевание представляет собой синдром высвобождения цитокинов.

[0135] Понятно, что каждый признак, или вариант осуществления, или комбинация, описанные в данном документе, представляют собой неограничивающий иллюстративный пример любого из аспектов настоящего изобретения и, следовательно, предполагается, что они являются комбинируемыми с любым другим признаком, или вариантом осуществления, или комбинацией, описанными в данном документе. Например, если признаки описаны с помощью выражений, таких как "один вариант осуществления", "некоторые варианты осуществления", "определенные варианты осуществления", "дополнительный вариант осуществления", "конкретные иллюстративные варианты осуществления" и/или "другой вариант осуществления", каждый из данных типов вариантов осуществления представляет собой неограничивающий пример признака, который предназначен для комбинирования с любым другим признаком или комбинацией признаков, описанными в данном документе, без необходимости перечисления каждой возможной комбинации. Такие признаки или комбинации признаков применимы к любому из аспектов настоящего изобретения. В случаях, где раскрываются примеры значений, попадающих в пределы диапазонов, любые из данных примеров рассматриваются как возможные конечные точки диапазона, рассматриваются любые и все числовые значения между такими конечными точками и предусматриваются любые и все комбинации верхних и нижних конечных точек.

[0136] Заголовки в данном документе предназначены для удобства читателя и не предназначены для ограничения. Дополнительные аспекты, варианты осуществления и вариации настоящего изобретения будут очевидны из разделов "Подробное описание", и/или "Графические материалы", и/или "Формула изобретения".

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0137] На фигурах 1A-1C показаны иллюстративные схематические изображения бивалентных и моновалентных антигенсвязывающих белков на основе mAb к TREM-1/мутеина IL-10. На фигуре 1D проиллюстрирована локализация присоединения мутеина IL-10 к антигенсвязывающему белку.

[0138] На фигуре 2 показано, что как бивалентное, так и моновалентное связывание TREM-1 значительно усиливало подавление активации моноцитов с помощью мутеина IL-10.

[0139] На фигурах 3A-3B проиллюстрировано, что антигенсвязывающие белки на основе mAb к TREM-1/мутеина IL-10 не стимулировали активацию CD8⁺ Т-клеток (фигура 3A) и В-клеток (фигура 3B).

[0140] На фигурах 4A-4H проиллюстрировано, что связывание TREM-1 значительно усиливало подавление активации моноцитов с помощью мутеина IL-10 для различных конструкций слитого белка.

[0141] На фигурах 5A-5B показано, что активность мутеина IL-10 в отношении моноцитов человека (фиг. 5A) или мыши (фиг. 5B), как продемонстрировано с помощью уровней TNF, улучшается посредством связывания TREM-1 слитым белком по сравнению с антителом или мутеином IL-10 по отдельности.

[0142] На фигурах 6A-6D показано ингибирование опосредованной лигандом (PGLYRP1/PGN) передачи сигнала с участием TREM-1 с помощью антител к TREM-1 человека в PBMC человека (фигура 6C-6D) или яванского макака (фигура 6A-6B), как измерено с помощью степени высвобождения TNF-альфа.

[0143] На фигуре 7 показано ингибирование с помощью Fab к TREM-1 человека опосредованной лигандом (PGLYRP1/PGN) передачи сигнала в линии клеток, сверхэкспрессирующих TREM-1/DAP12 человека, как измерено с помощью степени фосфорилирования тирозинкиназы селезенки (pSYK).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0144] Настоящее изобретение предусматривает мутеины IL-10 и антигенсвязывающие белки, содержащие мутеины IL-10. Антигенсвязывающие белки/слитые белки по настоящему изобретению демонстрируют улучшенное нацеливание на иммунные клетки и модуляцию клеточной активности и цитокинового ответа, применимые для лечения воспалительных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит или ревматоидный артрит. Таким образом, нацеливание ингибирующей активности IL-10 на миелоидные клетки могло бы обеспечивать эффективное лечение для воспалительного заболевания кишечника (IBD), не вызывающее побочных эффектов. Антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10, предусмотренный в данном документе, содержит антигенсвязывающий фрагмент, который может нацеливать мутеин IL-10 на воспалительные клетки. Подходящие антигенсвязывающие фрагменты включают антитела к TREM-1 и антитела к PD-1.

Определения

[0145] Термин "полипептидное связывающее средство" или "антигенсвязывающий белок" относится к полипептиду, который обладает способностью специфично связывать антиген, например мишень или ее партнера по передаче сигнала, или который способен связывать антиген с измеримой аффинностью связывания. Примеры полипептидных связывающих средств включают антитела, пептитела, полипептиды и пептиды, необязательно конъюгированные с другими пептидными фрагментами или непептидными фрагментами. Антигены, с которыми может связываться полипептидное связывающее средство, включают любую белковую или небелковую молекулу, которая обладает способностью вызывать ответ в виде выработки антитела или которая обладает способностью связываться с полипептидным связывающим средством с выявляемой аффинностью связывания, превышающей таковую для неспецифического связывания. Антиген, с которым связывается модулирующее полипептидное связывающее средство, может включать мишень, партнера мишени по передаче сигнала и/или комплекс, содержащий мишень и ее партнера по передаче сигнала. Антигенсвязывающие белки, предусмотренные в данном документе, могут дополнительно содержать часть другого полипептида, например, гетерологичный фрагмент в качестве части слитого белка. В данном случае антигенсвязывающий белок может содержать мутеин IL-10 и антигенсвязывающий фрагмент, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитые, соединенные или расположенные в последовательности с антигенсвязывающей частью или ее фрагментом.

[0146] Термин "антитело" используется в наиболее широком смысле и включает полностью собранные антитела, тетрамерные антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антитела, которые могут связывать антиген (например, Fab', F'(ab)₂, F_v, одноцепочечные антитела, диатела), и рекомбинантные пептиды, содержащие вышеуказанное, при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность. "Иммуноглобулин" или "тетрамерное антитело" представляет собой тетрамерный гликопротеин, который состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых содержит переменную область и константную область. Антигенсвязывающие части могут быть получены с применением методик рекомбинантной ДНК либо посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фрагменты антител или антигенсвязывающие части включают, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, доменное антитело (dAb), фрагменты определяющей комплементарности области (CDR), антитела с привитыми CDR, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитело, линейное антитело; хелатирующее рекомбинантное антитело, триспецифическое антитело или биспецифическое антитело, интратело, нанотело, иммунофармацевтическое средство на основе небольшого модульного белка (SMIP), слитый белок на основе антигенсвязывающего домена иммуноглобулина, камелизированное антитело, VHH-содержащее антитело или его вариант или производное

и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом, например, одну, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, до тех пор, пока антитело сохраняет требуемую биологическую активность.

[0147] Используемый в данном документе термин "моновалентный IgG" относится к IgG, где одиночный антигенсвязывающий фрагмент (Fab) слит с полным фрагментом константного домена (Fc), сконструированным для гетеродимеризации посредством мутаций в домене C_H3 в пределах Fc. Моновалентный IgG также известен как "одноплечевое" антитело.

[0148] "Моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

[0149] Используемое в данном документе выражение "вариант антитела" относится к полипептидной последовательности антитела, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, делецию или вставку в переменную область доменов переменной области природного антитела. Варианты могут быть по сути гомологичными или по сути идентичными немодифицированному антителу.

[0150] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и выделено из компонента его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более чем 95% по весу антитела, как определено по способу Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением окрашивания кумасси синим или, предпочтительно, серебром, или способов на основе HPLC. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

[0151] Используемое в данном документе выражение "переменная область тяжелой цепи" относится к области молекулы антитела, содержащей по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) переменной домена тяжелой цепи указанного антитела. Переменная область тяжелой цепи может содержать одну, две или три CDR тяжелой цепи указанного антитела.

[0152] Используемое в данном документе выражение "вариабельная область легкой цепи" относится к области молекулы антитела, содержащей по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) вариабельного домена легкой цепи указанного антитела. Вариабельная область легкой цепи может содержать одну, две или три CDR легкой цепи указанного антитела, которая может представлять собой легкую каппа- или лямбда-цепь в зависимости от антитела.

[0153] Как используется в данном документе, антитело, которое "специфично связывается", является "антигенспецифичным", является "специфичным в отношении" антигенной мишени или является "иммунореактивным" в отношении антигена, относится к антителу или полипептидному связывающему средству по настоящему изобретению, которое связывает антиген с большей аффинностью, чем другие антигены со сходной последовательностью. В одном аспекте антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению или его фрагменты, варианты или производные будут связываться с большей аффинностью с антигеном человека по сравнению с их аффинностью связывания в отношении сходных антигенов других, т. е. отличных от человека, видов, однако полипептидные связывающие средства, которые распознают и связывают ортологи мишени, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[0154] Термин "эпитоп" относится к той части любой молекулы, которая может быть распознана и связана селективным связывающим средством в одной или нескольких антигенсвязывающих областях. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводные боковые цепи, и обладают специфическими характеристиками трехмерной структуры, а также специфическими характеристиками заряда. Эпитопы, как используется в данном документе, могут быть непрерывными или прерывистыми.

[0155] Термин "производное" при использовании в связи с полипептидными связывающими средствами и полипептидами по настоящему изобретению относится к полипептидам, химически модифицированным посредством методик, таких как убиквитинирование, конъюгация с терапевтическими или диагностическими средствами, мечение (например, с помощью радионуклидов или различных ферментов), ковалентное присоединение полимера, такое как пэгилирование (дерииватизация с помощью полиэтиленгликоля), и вставка или замена аминокислот путем химического синтеза, таких как орнитин, которые обычно не встречаются в человеческих белках. Производные сохраняют связывающие свойства недерииватизированных молекул по настоящему изобретению.

[0156] Используемый в данном документе термин "линкер" относится к пептиду, который соединяет два полипептида. Длина линкера может составлять 1-80 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина линкера может составлять 2-40, 3-40, 3-30 или 3-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой пептид длиной 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 аминокислоты. В других вариантах осуществления длина линкера может составлять 3-25, 3-18, 5-20, 6-18

или 10-20 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера может составлять приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Во многих случаях линкеры не содержат свободные цистеиновые остатки (т. е. и, таким образом, не участвуют в дисульфидных связях) и также не содержат сайты N-гликозилирования (то есть Asn - Xxx - Ser/Thr, где X может представлять собой любую аминокислоту за исключением пролина). В определенных вариантах осуществления пептид, имеющий последовательность G3SG2 (SEQ ID NO: 2676) или G4S (SEQ ID NO: 2725), представляет собой линкер между антигенсвязывающим белком, связывающим TREM-1, и мутеином IL-10. Примеры других подходящих линкеров включают G2, G3, G3S (SEQ ID NO: 2705), G3P (SEQ ID NO: 2706), G3Q (SEQ ID NO: 2707) и G5 (SEQ ID NO: 2705), среди множества других. Каждая заглавная буква в вышеуказанных линкерах относится к общепринятому однобуквенному коду для обозначения аминокислоты, и каждое число относится к числу tandemных повторов аминокислоты в линкере. Например, "G3SG2 (SEQ ID NO: 2676)" относится к линкеру, имеющему последовательность Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2676). "G4S" относится к линкеру, имеющему последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2725).

[0157] "Терапевтически эффективное количество" лекарственного средства, используемое для лечения заболевания, представляет собой количество, которое может снижать степень тяжести заболевания, снижать степень тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или его лечением, или замедлять развитие более серьезных симптомов или более серьезного заболевания, которое может встречаться с некоторой частотой после состояния, подвергающегося лечению.

[0158] "Лечение" любого заболевания, упоминаемого в данном документе, охватывает облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания, снижение степени тяжести заболевания или замедление или предупреждение прогрессирования заболевания с развитием более серьезных симптомов, которые могут, в некоторых случаях, сопровождать заболевание или приводить к по меньшей мере одному другому заболеванию. Лечение не обязательно означает, что заболевание полностью излечено. Применимое терапевтическое средство должно только снижать степень тяжести заболевания, снижать степень тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или его лечением, или замедлять развитие более серьезных симптомов или более серьезного заболевания, которое может встречаться с некоторой частотой после состояния, подвергающегося лечению. Например, если бы заболевание представляло собой воспалительное заболевание кишечника, терапевтическое средство, применяемое в качестве лечения, могло бы уменьшать число отдельных участков воспаления в кишечнике или общую протяженность пораженного кишечника. Оно может уменьшать боль и/или отек, уменьшать симптомы, такие как диарея, запор или рвота, и/или предупреждать перфорацию кишечника.

[0159] Термин "субъект" охватывает млекопитающих и субъектов, отличных от млекопитающих. Примеры млекопитающих включают без ограничения любого члена класса млекопитающих: людей, приматов, отличных от человека, таких как шимпанзе, и другие виды человекообразных обезьян и мартышек; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи; домашних животных, таких как кролики, собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки, и т. п. Примеры субъектов, отличных от млекопитающих, включают без ограничения птиц, рыб и т. п. Термин не обозначает конкретный возраст или пол.

[0160] Используемый в данном документе термин "миелоидная клетка" относится к подгруппе иммунных клеток, полученных из кровяных клеток-предшественников миелоидной линии, и включает гранулоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки (DC). Миелоидные клетки выполняют важную функцию в защитном иммунитете, при этом они часто характеризуются функциями фагоцитов и антигенпрезентирующих клеток (APC). См., например, de Kleer et al., *Front. Immunol.*, 5:423, 2014.

Интерлейкин-10

[0161] Интерлейкин-10 (IL-10) представляет собой воспалительный цитокин, который участвует в ряде процессов иммунорегуляции. IL-10 передает сигнал через рецепторный комплекс, состоящий из двух белков рецептора IL-10 1 (IL10R1) и двух белков рецептора IL-10 2 (IL-10R2). Биологически активная форма IL-10 представляет собой гомодимер, который связывается с IL-10R1/IL-10R2 и передает сигнал через пути Jak1/Tyk2 и stat3. IL-10 характеризуется более высокой аффинностью в отношении IL-10R1 по сравнению с IL-10R2. IL-10 экспрессируется в виде 178-аминокислотного белка, содержащего 18-аминокислотный сигнальный пептид. Вторичная структура гомодимера IL-10 демонстрирует замену домена типа "спираль-поворот-спираль", состоящую из 6 α -спиралей в каждом домене, спиралей A, B, C, D, E и F. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность IL-10 человека изложены под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. SEQ ID NO: 2 относится к зрелому IL-10 человека без сигнальной последовательности.

[0162] IL-10 человека (hIL-10) и IL-10 вируса Эпштейна-Барр (vIL-10) характеризуются ~83% идентичностью последовательности и сходной вторичной структурой. vIL-10 подавляет выработку воспалительного цитокина, и ингибирует экспрессию МНС II в макрофагах, и предупреждает пролиферацию Т-клеток. vIL-10 не осуществляет совместную стимуляцию пролиферации тимоцитов и тучных клеток, и не индуцирует экспрессию МНС класса II В-клеток, и характеризуется более низкой аффинностью в отношении IL-10R1 клеточной поверхности. Ala87 (Ile у человека) представляет собой ключевой остаток, участвующий в снижении иммуностимулирующей активности vIL-10.

[0163] IL-10 человека и IL-10 у яванского макака (IL-10 яванского макака) характеризуются примерно 96% идентичностью последовательности, в то время как IL-

10R1 человека и яванского макака характеризуются примерно 93% идентичностью последовательности. Между IL-10R1 человека и яванского макака наблюдается отличие по 4 аминокислотам на интерфейсе связывания. I45T и E46G находятся на петле, которая взаимодействует с петлей АВ IL-10, хотя взаимодействие преимущественно осуществляется в основной цепи. A189T и S192T находятся на петле, которая взаимодействует со спиралью А, однако без прямого взаимодействия с IL-10. В IL-10 наблюдаются отличия по 2 аминокислотам вблизи интерфейса связывания IL-10R1 для IL-10 человека и яванского макака, оба из N21 и L46 у человека прилегают к поверхности взаимодействия IL-10/IL-10R1.

[0164] Предыдущие исследования показали, что ингибирование миелоидных клеток с помощью IL-10 является достаточным для лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD). Однако клиническая эффективность IL-10 была ограничена дозолимитирующей токсичностью. Чтобы обойти данную проблему, в данном документе предусмотрены мутеины IL-10, разработанные таким образом, чтобы они обладали сниженной активностью для минимизации системных нежелательных побочных эффектов, но одновременно сохраняли иммуносупрессивные свойства для лечения IBD. Лечение мутеином IL-10 с аттенуированной активностью может смягчать некоторые из иммуностимулирующих эффектов цитокина. Для устранения возможного снижения предпочтительных иммуносупрессивных эффектов мутеины IL-10 слиты с нацеливающим фрагментом (например, антителом) для повышения локальной концентрации в моноцитах, регуляторных Т-клетках и CD4⁺ Т-клетках.

[0165] Мутеины IL-10 нацеливали на различные участки белка IL-10, включая сайт Ia, который взаимодействует с IL-10R1 в спирали А, спирали F и петле АВ, и сайт Ib, который взаимодействует с IL-10R1 в спирали А, спирали F, петле АВ, спирали В, спирали С, петле CD и спирали Е. Мутеины включают изменения в одном или нескольких из следующих остатков: сайт Ia (спираль А), K34, T35, Q38; сайт Ia (спираль F), I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145; сайт Ib (спираль А), H14, F15, M22, P20, L23, R24, R27, D28; сайт Ib (F), E151, M154, M156, K157, N160; сайт Ia (петля АВ), M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49; спираль В, F56, K57, Y59; спираль С, L60, E67, Q70, M77, M79; петля CD, N82, Q83, D84, P85, D86, I87; спираль D, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116; или спираль Е, A127, K130.

[0166] Аминокислотные последовательности определенных мутеинов IL-10 изложены под SEQ ID NO: 3-10, и SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508,

2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, и 2777-2791 и в таблице 1, таблице 16, таблице 17 и таблице 21.

[0167] Мутеины IL-10 и антигенсвязывающий белки, описанные в данном документе, можно подвергать скринингу в отношении аффинности связывания посредством способов, известных из уровня техники. Например, можно применять анализы задержки электрофоретического сдвига в геле, вестерн-блоттинг, конкурентный анализ с использованием радиоактивной метки, совместное фракционирование с помощью хроматографии, совместное осаждение, перекрестное связывание, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), KinExA и т. п., которые описаны, например, в Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0168] Мутеины IL-10 по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются сниженной активностью по сравнению с активностью IL-10 wt. В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 характеризуется снижением активности в от приблизительно 10 раз до приблизительно 5000 раз по сравнению с IL-10 wt. В различных вариантах осуществления мутеины IL-10 характеризуются в приблизительно 10-1000 раз более низкой активностью, в приблизительно 50-500 раз более низкой активностью, в приблизительно 100-500 раз или более сниженной активностью. В различных вариантах осуществления активность измеряют в ходе анализа стимуляции LPS. В некоторых вариантах осуществления результат анализа представляет собой LPS-индуцированную выработку TNF α в моноцитах/миелоидных клетках.

Антигенсвязывающие белки и антитела

[0169] Вариабельные домены иммуноглобулина демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями или CDR. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот по каждому домену соответствует определениям из Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989.

[0170] Гипервариабельная область антитела относится к аминокислотным остаткам CDR антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из CDR [например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] и/или такие остатки из гипервариабельной петли (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как описано в [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]. CDR также были идентифицированы и пронумерованы в соответствии с системой нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., The

Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003), где описаны положения CDR в переменных доменах легкой и тяжелой цепи следующим образом: CDR1, примерно остатки 27-38; CDR2, примерно остатки 56-65; и CDR3, примерно остатки 105-116 (зародышевая линия) или остатки 105-117 (перегруппированная). В одном варианте осуществления предусматривается, что CDR расположены примерно в положении остатков 26-31 (L1), 49-51 (L2) и 88-98 (L3) в переменном домене легкой цепи и примерно в положении остатков 26-33 (H1), 51-58 (H2) и 97-110 (H3) в переменном домене тяжелой цепи из тяжелой или легкой цепей антитела с примерно сходной длиной по сравнению с таковыми, раскрытыми в данном документе. Однако специалисту в данной области понятно, что фактическое положение остатков CDR может отличаться от проецируемых остатков, описанных выше, при идентификации последовательности конкретного антитела. CDR, раскрытые в данном документе, определяют в соответствии с методикой Kabat (Kabat and Wu, 1991) и нумеруются с применением идентификационной системы нумерации Amgen. Идентификационная система нумерации Amgen представляет собой основанную на структуре систему нумерации, построенную на основе системы нумерации Honegger и Plückthun для переменных областей антител, описанной в Honegger and Plückthun, (*J Mol Biol.* 309(3):657-70, 2001). В различных вариантах осуществления предусмотрено сконструированное антитело IgG1. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1z или IgG1z-SEFL2, описанное в данном документе.

[0171] Остатки каркасной области (или FR) представляют собой те остатки переменного домена, которые не относятся к остаткам гиперпеременной области.

[0172] Как описано ниже, антитела, включая моноклональные, человеческие, гуманизированные и другие антитела, описанные в данном документе, предусмотренные в данном документе, как правило, получают рекомбинантным способом или посредством других способов манипуляции с применением генетического кода *in vitro* или *in vivo*, и, таким образом, они необязательно отражают конкретное антитело, которое встречается в природе.

[0173] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфично связывается с белком клеточной поверхности таким образом, что IL-10 или мутеин IL-10 направляются к определенному типу клеток. Такие типы клеток, представляющие интерес, включают миелоидные клетки, CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки и В-клетки. Антигенсвязывающий белок может специфично связываться с TREM-1 для направления фрагментов IL-10 к миелоидным клеткам; с PD1, CD8, LAG3, NKG2D, NKG7 или другими белками поверхности CD8⁺ Т-клеток для CD8⁺ Т-клеток; связываться с CD4 или другими белками поверхности CD4⁺ Т-клеток, такими как CD30, OX40, 41BB, ICOS, для CD4⁺ Т-клеток; и связываться с CD20, CD19 или другими белками поверхности В-клеток, такими как BAFFR, для В-клеток.

[0174] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфично связывается с белком клеточной поверхности, который играет роль в

модуляции контрольной точки иммунного ответа. Такие модуляторы контрольной точки иммунного ответа включают PD-1, CTLA4, CD28, CD80, CD86 и т. п.

[0175] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфично связывается с белками клеточной поверхности, более выражено экспрессируемых в конкретных тканях или органах (например, в кишечнике или легком), чем в других органах или тканях. Такие тканеспецифические или органоспецифические белки клеточной поверхности включают MAdCAM1 в кишечнике, сурфактант или RAGE в легком. Слитые белки на основе мутеинов IL-10 с такими антигенсвязывающими белками являются применимыми в лечении таких воспалительных заболеваний, как IBD, астма и хроническая обструктивная болезнь легких (COPD).

[0176] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок специфично связывается с белками клеточной поверхности, более выражено экспрессируемыми на опухолевых/раковых клетках, чем на клетках без рака. Такие антигены, специфические в отношении опухоли/рака, включают BCMA, CD19, CD20, CD22, CD70, CD123, CEA, CDH3, CLDN6, CLL1, CS1, DCAF4L2, FLT3, GABRP, MageB2, MART-1, MSLN, MUC1 (например, MUC1-C), MUC12, MUC13, MUC16, mutFGFR3, PRSS21, PSMA, RNF43, STEAP1, STEAP2, TM4SF5, PD-1, CTLA4, EGFR, VEGF, OX40 или FcRL5.

[0177] *Антигенсвязывающие белки, связывающие TREM-1*

[0178] В предыдущих исследованиях, направленных на определение характеристик передачи сигнала с помощью TREM-1, применяли агонистические антитела к TREM-1 для имитации активации рецептора лигандом (Tessarz et al., Immunol Lett 116(2):111-6, 2008; Vandestienne et al., J Clin Invest 131(2):e142468, 2021). С помощью пептидов-ловушек также пытались модулировать активность TREM-1 (см., например, публикацию международной заявки на патент № WO2014037565A).

[0179] Настоящее изобретение охватывает применение аминокислотных молекул, кодирующих антитела, специфичные в отношении мишени. Антигенсвязывающие белки, связывающие TREM-1, описанные в данном документе, дифференциально модулируют взаимодействие TREM-1 человека и его лигандов.

[0180] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антигенсвязывающий белок, который содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную вариабельной области тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186, и/или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную вариабельной области легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185, при этом антитело дополнительно содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или все

из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность с процентной долей идентичности по отношению к вариабельной области легкой цепи может содержать одну, две или три CDR легкой цепи. В других вариантах осуществления аминокислотная последовательность с процентной долей идентичности по отношению к вариабельной области тяжелой цепи может содержать одну, две или три CDR тяжелой цепи.

[0181] В другом варианте осуществления предусмотрен антигенсвязывающий белок, который содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную всем трем HCDR в вариабельной области тяжелой цепи из последовательности антитела, изложенной выше, или CDR: последовательности CDR1 тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196; последовательности CDR2 тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и последовательности CDR3 тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0182] В родственном варианте осуществления предусмотрен антигенсвязывающий белок, который содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную всем трем LCDR в вариабельной области легкой цепи из последовательности антитела, изложенным выше, или CDR: последовательности CDR1 легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190; последовательности CDR2 легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191; последовательности CDR3 легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192.

[0183] Предусматривается, что антитела по настоящему изобретению могут содержать одну, или две, или более аминокислотных замен в областях CDR антитела, например, неконсервативные или консервативные замены. Также предусмотрены консенсусные последовательности CDR и/или последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей антитела к TREM-1, раскрытые в данном документе. Например, антитела или антигенсвязывающие белки/слитые белки, связывающие TREM-1, могут содержать следующие последовательности. В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR1, выбранную из группы, состоящей из $X_1ASQSX_2X_3X_4NLA$ (SEQ ID NO: 2199), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой V или I, где X_3 представляет собой N или S, и где X_4 представляет

собой S, H, I, V или A; QASX₁DIX₂X₃X₄LN (SEQ ID NO: 2204), где X₁ представляет собой R или Q, где X₂ представляет собой R, S, N или F, где X₃ представляет собой K или N, и где X₄ представляет собой H, Y или D; RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2212); QASQDIRKHLN (SEQ ID NO: 2213); RASQDISSNLN (SEQ ID NO: 2214); QASQDIHLN (SEQ ID NO: 2215); RASQGIRKWLA (SEQ ID NO: 2216) или RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2217) и SGDKLGERVS (SEQ ID NO: 2218).

[0184] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR2, выбранную из группы, состоящей из GAX₁X₂RAT (SEQ ID NO: 2200), где X₁ представляет собой S или Y, и где X₂ представляет собой T или I; аминокислотной последовательности X₁X₂X₃X₄LET (SEQ ID NO: 2206), где X₁ представляет собой D, G или H, где X₂ представляет собой A, V или T, где X₃ представляет собой S, A или Y и где X₄ представляет собой T или N; GASTRAT (SEQ ID NO: 2219); DASNLET (SEQ ID NO: 2220) и AASRLQS (SEQ ID NO: 2221).

[0185] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность LCDR3, выбранную из группы, состоящей из QX₁X₂X₃X₄X₅X₆PX₇T (SEQ ID NO: 2201); где X₁ представляет собой Q, H или E, где X₂ представляет собой F или Y, где X₃ представляет собой K, Y или I, где X₄ представляет собой N, T, L, I или M; где X₅ представляет собой W, F, H или Y, где X₆ отсутствует или представляет собой P; где X₇ представляет собой W, N, Y, H или L; QX₁YX₃X₄X₅PX₆T (SEQ ID NO: 2207), где X₁ представляет собой Q или H, где X₂ представляет собой D, A или G, где X₃ представляет собой N или K; где X₄ представляет собой L или I, и где X₅ представляет собой I или L; QQFKNWPPT (SEQ ID NO: 2222); QHYDNLPT (SEQ ID NO: 2223); LQANGFPWT (SEQ ID NO: 2224); QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 2225) и QFWPPWT (SEQ ID NO: 2226).

[0186] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR1, выбранную из группы, состоящей из X₁X₂X₃MX₄ (SEQ ID NO: 2202), где X₁ представляет собой A, R, T или S, где X₂ представляет собой Y или N, где X₃ представляет собой A или W, и где X₄ представляет собой S или N; последовательности X₁YDIN (SEQ ID NO: 2208), где X₁ представляет собой R или S; GYYX₁H (SEQ ID NO: 2723), где X₁ представляет собой M или I; AYAMS (SEQ ID NO: 2227); RYDIN (SEQ ID NO: 2228) и SYWMS (SEQ ID NO: 2229).

[0187] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR2, выбранную из группы, состоящей из X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇ X₈X₉YYX₁₀X₁₁X₁₂VKG

(SEQ ID NO: 2205), где X_1 представляет собой T, E или S, где X_2 отсутствует или представляет собой M, V или I, где X_3 представляет собой S, R или K, где X_4 представляет собой G или Q, где X_5 представляет собой S, D или H, где X_6 представляет собой G, S, L или A, где X_7 представляет собой S, G или R, где X_8 представляет собой T, S, P или E, где X_9 представляет собой T или I, где X_{10} представляет собой A или V, где X_{11} представляет собой D или E, и где X_{12} представляет собой S или A; $X_1X_2NPX_3X_4GX_5X_6GX_7X_8X_9X_{10}FX_{11}X_{12}$ (SEQ ID NO: 2209), где X_1 представляет собой W или R, где X_2 представляет собой M или L, где X_3 представляет собой N, Q или K, где X_4 представляет собой S, A или R, где X_5 представляет собой N или Q, где X_6 представляет собой S, A или T, где X_7 представляет собой S, Q или Y, где X_8 представляет собой V или T, где X_9 представляет собой Q или K, где X_{10} представляет собой K или N, где X_{11} представляет собой R или Q, и где X_{12} представляет собой G или D; TSGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2230); WMNPNSGNSSVQKFRG (SEQ ID NO: 2231); NIKQDGSEYYVDSVK (SEQ ID NO: 2232) и TSGSGTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2669).

[0188] В различных вариантах осуществления антитело к TREM-1 содержит антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность HCDR3, выбранную из группы, состоящей из $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7FX_8YYX_9$ (SEQ ID NO: 2203), где X_1 представляет собой V, E, A или G, где X_2 представляет собой A, F, Y или G, где X_3 представляет собой G, S, Y или W, где X_4 представляет собой S или R, где X_5 отсутствует или представляет собой N, где X_6 представляет собой F, S, Y или отсутствует, где X_7 представляет собой L или F или отсутствует, где X_8 представляет собой D или E, и где X_9 представляет собой Y, H или S; $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}FX_{13}X_{14}$ (SEQ ID NO: 2210); где X_1 представляет собой G, L или R, где X_2 представляет собой G, I или R, где X_3 представляет собой Y, R, I, G или A, где X_4 представляет собой T, S, Y или V, где X_5 представляет собой S или Y, где X_6 представляет собой S, A, I или R, где X_7 представляет собой W, A или S, где X_8 отсутствует или представляет собой S, где X_9 отсутствует или представляет собой F, W или Y, где X_{10} представляет собой R, S, H, K или E, где X_{11} представляет собой W, H, Y или F, где X_{12} представляет собой Y, V, A или S, где X_{13} представляет собой D или Q, и где X_{14} представляет собой L, Y, I или H; VAGSNFLFDY (SEQ ID NO: 2670); GGYTSSWRWYFDL (SEQ ID NO: 2671); GGYTSSWSRWYFDL (SEQ ID NO: 2672) и DYGDSEFDY (SEQ ID NO: 2673).

[0189] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); и

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0190] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3); и

vii) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3).

[0191] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит набор последовательностей CDR, выбранных из легкой цепи под SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3) и тяжелой цепи под SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3).

[0192] В родственном варианте осуществления остатки каркаса являются измененными. Каркасные области тяжелой цепи, которые могут быть изменены, располагаются в пределах областей, обозначенных H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, которые окружают остатки CDR тяжелой цепи, и остатки каркасных областей легкой цепи, которые могут быть изменены, располагаются в пределах областей, обозначенных L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, которые окружают остатки CDR легкой цепи. Аминокислота в пределах каркасной области может быть заменена, например, любой подходящей аминокислотой, идентифицированной в каркасе человека или консенсусном каркасе человека. Дополнительно предусматривается, что каркасные области могут быть изменены, однако антигенсвязывающий белок или антитела, описанные в данном документе, сохраняют CDR, LCDR1-3 и/или HCDR-3 из исходных антител.

[0193] Фрагменты антител содержат часть интактного полноразмерного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fcab и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); фрагменты полиспецифических антител, таких как биспецифические, триспецифические и т. д. антитела (например, диатела, триатела, тетратела); миниантитела; хелатирующее рекомбинантное антитело; триспецифические антитела или биспецифические антитела; интратела; нанотела; слитые белки на основе антигенсвязывающего домена иммуноглобулина; камелизированные антитела; VHH-содержащие антитела и другие полипептиды, образованные из фрагментов антител. См., например, Holliger & Hudson, 2005 *Nat. Biotech.* 23:1126-36; Eyer & Hruska, *Veterinari Medicina* 57:439-513, 2012.

[0194] Антигенсвязывающие соединения по настоящему изобретению предпочтительно сохраняют аффинность связывания в отношении TREM-1, составляющую 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} М или меньше, как измерено с

помощью поверхностного плазмонного резонанса или KinexA. Антигенсвязывающие соединения по настоящему изобретению характеризуются аффинностью связывания в отношении TREM-1, составляющей от 10^{-9} до 10^{-12} , или от 10^{-10} до 10^{-13} , или от 10^{-10} до 10^{-15} М. Анализ SPR выполняют с применением стандартных способов, например, при 25°C (например, при комнатной температуре).

[0195] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1z.

[0196] В данном документе предусмотрены примеры полноразмерных антител, которые связывают TREM-1, содержащие аминокислотные последовательности тяжелой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 186, 206, 226, 246, 266, 286 и 2186; и соответствующие аминокислотные последовательности легкой цепи, изложенные под SEQ ID NO: 25, 45, 65, 85, 105, 125, 145, 165, 185, 205, 225, 245, 265, 285 и 2185.

Антигенсвязывающие белки, содержащие IL-10

[0197] В данном документе дополнительно предусмотрены антигенсвязывающие белки между мутеинами IL-10 и антителами или другими связывающими белками, которые нацеливаются на субпопуляции иммунных клеток. Иллюстративные антитела или антигенсвязывающие белки включают антитела или связывающие белки, которые нацеливаются на TREM-1 или целевые ингибиторы контрольных точек, такие как PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, антитела или связывающие белки, которые нацеливаются на TNF α , или антитела или связывающие белки, которые нацеливаются на IL-12/IL-23.

[0198] Антитела к ингибиторам контрольных точек включают без ограничения антитела к PD-1, такие как пембролизумаб (KEYTRUDA®, Merck Sharp & Dohme Corp.), ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb), и антитела к PD-1, описанные в патентах США №№ 8735553; 8617546; 8008449; 8741295; 8552154; 8354509; 8779105; 7563869; 8287856; 8927697; 8088905; 7595048; 8168179; 6808710; 7943743; 8246955 и 8217149 и публикации международной заявки на патент WO 2019/140196; антитела к CTLA-4, такие как ипилимумаб (YERVOY®) и тремелиумаб, и антитела к PD-L1, такие как дурвалумаб.

[0199] Иллюстративные последовательности антигенсвязывающих белков на основе мутеина IL-10/антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085 и SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960,

962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086. Дополнительные антигенсвязывающие белки на основе тяжелой цепи-IL-10, связывающие TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 2137, 2139, 2141, 2143, 2145, 2147, 2149, 2151, 2153, 2155, 2157, 2159, 2161, 2163, 2165, 2167, 2169, 2171, 2173, 2175, 2177, 2179, 2181, 2359, 2361, 2363, 2365, 2367, 2369, 2371, 2373, 2375, 2377, 2379, 2381, 2383, 2385, 2387, 2389, 2391, 2393, 2395, 2397, 2399, 2401, 2403, 2405, 2407, 2409, 2411, 2143, 2415, 2417, 2419, 2421, 2423, 2425, 2427, 2429, 2431, 2433, 2435, 2437, 2439, 2441, 2443, 2445, 2447, 2449, 2451, 2453, 2455, 2457, 2459, 2461, 2463, 2465, 2467, 2469, 2471, 2473, 2475, 2477, 2479, 2481, 2483, 2485, 2487, 2489, 2491, 2493, 2495, 2497, 2498, 2499, 2501, 2503, 2505, 2507, 2509, 2511, 2513, 2515, 2517, 2519, 2521, 2523, 2525, 2527, 2529, 2531, 2533, 2535, 2537, 2539 и 2726-2776.

[0200] Примеры моновалентных антигенсвязывающих белков на основе антитела к TREM-1 изложены в виде аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 1087-1422 и в таблице 13B.

[0201] Нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие белки, содержащие мутеины IL-10 и антитела к TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 303-862, и варианты вариабельные области тяжелой цепи антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 2012, 2014, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052, 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086, 2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120, 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, и 2136, и вариабельные области легкой цепи вариантного антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 2234, 2236, 2238, 2240, 2242, 2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256, 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290, 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324, 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, и 2358.

[0202] В данном документе предусмотрен антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где а. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела, б. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным, с. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов IL-10 человека, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2, и d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с С-концом антигенсвязывающего фрагмента.

[0203] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка: а. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, и b. фрагмент IL-10 слит с каждой тяжелой цепью антитела.

[0204] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка каждый фрагмент IL-10 представляет собой мономер. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит два разных мономера мутеина. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит два одинаковых мономера мутеина.

[0205] В различных вариантах осуществления для антигенсвязывающего белка каждый фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей AB, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали A, спирали B, спирали C, спирали D, спирали E и/или спирали F.

[0206] В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали A. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали F. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в петле спиралей AB.

[0207] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 снижает степень подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8+ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt.

[0208] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках при одновременном снижении уровня активации CD8+ Т-клеток и В-клеток.

[0209] В различных вариантах осуществления лечение ингибирует выработку TNF- α в моноцитах без стимуляции CD8+ Т-клеток и/или стимуляции В-клеток у субъекта.

[0210] В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q3, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, N160 в SEQ ID NO: 2 и/или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0211] В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из R27L, K34D, D41G,

L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D или I87A в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D, при этом он необязательно предусматривает добавление аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676). Мутеин IL-10 необязательно предусматривает комбинацию мутаций, изложенных в таблице 1, таблице 16, таблице 17 или таблице 21.

[0212] В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D или I87A под SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления каждый мутеин IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, ИЛИ N160D в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E. В различных вариантах осуществления аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676). В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность мутеина IL-10 изложена под SEQ ID NO: 3-10 и SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2540 и 2777-2791.

[0213] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере один линкер, слитый с по меньшей мере одним С-концом

антигенсвязывающего фрагмента, и фрагмент, представляющий собой мутеин IL-10, ковалентно связан с С-концом каждого линкера. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет 4-18 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет шесть аминокислот. В различных вариантах осуществления линкер представляет собой 3-мерный, 4-мерный, 5-мерный, 6-мерный, 7-мерный или 8-мерный пептид. В различных вариантах осуществления линкер содержит остатки GS. Дополнительные линкеры, предусмотренные для применения, описаны ниже.

[0214] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человека, присоединенную к указанной переменной области тяжелой цепи из части антигенсвязывающего белка, представляющей собой антитело. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной переменной области легкой цепи из части антигенсвязывающего белка, представляющей собой антитело.

[0215] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, Fab, F(ab')₂, Fab₂, моновалентного IgG, scFv, scFv-Fc, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1z. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моновалентный IgG. В различных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента выбрана из константных областей тяжелой цепи IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагментов, их комбинаций и их модификаций, где от одной до десяти аминокислот каркаса тяжелой цепи замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой константной области антитела человека.

[0216] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент связывается с PD-1 человека, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывается с TREM-1 человека с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 10^{-8} М.

[0217] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывает свой антиген с аффинностью связывания, составляющей от 10^{-8} М до 10^{-15} М,

или от 10^{-8} М до 10^{-12} М, или 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М или 10^{-15} М.

[0218] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

б. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0219] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка

а. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 110, 150, 170 или 290;

б. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 111, 151, 171 или 291;

с. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 32, 52, 72, 112, 152, 172 или 292;

д. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 116, 156, 176 или 296;

е. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 117, 157, 177 или 297; и

ф. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 118, 158, 178 или 298.

[0220] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка

а. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 50 или 110;

б. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 51 или 111;

- с. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 52 или 112;
- d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 56 или 116;
- е. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 57 или 117; и
- f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 58 или 118.

[0221] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит набор последовательностей CDR, выбранных из

- i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);
- ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);
- iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);
- iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);
- v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);
- vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);
- vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);
- viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);
- ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);
- x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);
- xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);
- xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);
- xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);
- xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); и
- xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0222] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

б. переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184; и

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2186.

[0223] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду,

состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 119, 159, 179 и 299; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 120, 160, 180 и 300.

[0224] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 121;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 59 и 119; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 62 и 122;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 60 и 120.

[0225] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, или антигенсвязывающая часть антигенсвязывающего белка, связывающая TREM-1, содержит

- i) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 41, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 42;
- ii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62;
- iii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 82;
- iv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 101, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 102;
- v) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 122;
- vi) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 141, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 142;
- vii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 162;
- viii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 182;
- ix) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 201, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 202;
- x) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 221, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 222;
- xi) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 241, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 242;
- xii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 261, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 262;
- xiii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 281, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 282;
- xiv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 302; или
- xv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 2185, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 2186.

[0226] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка аминокислотные последовательности могут быть на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185 и SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0227] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, на по

меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0228] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0229] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 142, 162, 182 и 302, и аминокислотную последовательность легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 141, 161, 181, и 301.

[0230] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 62 и 122, и аминокислотную последовательность легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 61 и 121.

[0231] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085, и аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0232] В различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены варианты вариабельных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к TREM-1. Вариантные последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931,

1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, 2007, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, 2135 и в таблице 10 и таблице 11, и вариантные последовательности вариабельной области легкой цепи антитела к TREM-1 изложены под SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, 2357, в таблице 10 и таблице 11. Предусматривается, что антигенсвязывающий белок TREM-1-IL-10 содержит вариантную последовательность тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела к TREM-1, раскрытую в данном документе.

[0233] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающих белков одна или несколько аминокислот каркаса тяжелой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека. В различных вариантах осуществления одна или несколько аминокислот каркаса легкой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности человеческого антитела.

[0234] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, дополнительно содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области легкой цепи.

[0235] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025,

1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085; и каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0236] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок может быть моновалентным. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента II-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1087, 1090, 1093, 1096, 1105, 1108, 1111, 1114, 1117, 1123, 1126, 1129, 1132, 1138, 1141, 1147, 1150, 1153, 1156, 1159, 1162, 1165, 1168, 1171, 1174, 1177, 1180, 1183, 1186, 1189, 1192, 1195, 1198, 1201, 1204, 1207, 1210, 1213, 1216, 1219, 1222, 1225, 1228, 1231, 1237, 1240, 1243, 1246, 1252, 1255, 1258, 1261, 1264, 1267, 1270, 1273, 1276, 1279, 1285, 1288, 1294, 1297, 1300, 1303, 1309, 1312, 1315, 1318, 1321, 1324, 1333, 1336, 1342, 1345, 1348, 1351, 1354, 1357, 1360, 1363, 1366, 1369, 1372, 1375, 1378, 1381, 1384, 1387, 1390, 1393, 1396, 1399, 1402, 1408, 1411, 1414, 1417, и 1420. В различных вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1088, 1091, 1094, 1097, 1106, 1109, 1112, 1115, 1118, 1124, 1127, 1130, 1133, 1139, 1142, 1148, 1151, 1154, 1157, 1160, 1163, 1166, 1169, 1172, 1175, 1178, 1181, 1184, 1187, 1190, 1193, 1196, 1199, 1202, 1205, 1208, 1211, 1214, 1217, 1220, 1223, 1226, 1229, 1232, 1238, 1241, 1244, 1247, 1253, 1256, 1259, 1262, 1265, 1268, 1271, 1274, 1277, 1280, 1286, 1289, 1295, 1298, 1301, 1304, 1310, 1313, 1316, 1319, 1322, 1325, 1334, 1337, 1343, 1346, 1349, 1352, 1355, 1358, 1361, 1364, 1367, 1370, 1373, 1376, 1379, 1382, 1385, 1388, 1391, 1394, 1397, 1400, 1403, 1409, 1412, 1415, 1418 и 1421. В различных вариантах осуществления моновалентный антигенсвязывающий белок дополнительно содержит Fc-область, например, изложенную под SEQ ID NO: 1089, 1092, 1095, 1098, 1107, 1110, 1113, 1116, 1119, 1125, 1128, 1131, 1134, 1140, 1143, 1149, 1152, 1155, 1158, 1161, 1164, 1167, 1170, 1173, 1176, 1179, 1182, 1185, 1188, 1191, 1194, 1197, 1200, 1203, 1206, 1209, 1212, 1215, 1218, 1221, 1224, 1227, 1230, 1233, 1239, 1242, 1245, 1248, 1254, 1257, 1260, 1263, 1266, 1269, 1272, 1275, 1278, 1281, 1287, 1290, 1296, 1299, 1302, 1305, 1311, 1314, 1317, 1320, 1323, 1326, 1335, 1338, 1344, 1347, 1350, 1353, 1356, 1359, 1362, 1365, 1368, 1371, 1374, 1377, 1380, 1383, 1386, 1389, 1392, 1395, 1398, 1401, 1404, 1410, 1413, 1416, 1419 и 1422.

[0237] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, 2007, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, 2135 и последовательностей, изложенных в таблице 10, таблице 11, таблице 16 и таблице 17; и каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, 2357, и последовательностей, изложенных в таблице 10 и таблице 11. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007, и каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588,

2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605.

[0238] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи: каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи; каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135, и каждая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, И 2357.

[0239] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 2726-2776. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2726-2776. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи-фрагмента IL-10, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2727-2732.

[0240] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2727 или 2728 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554, или другую легкую цепь 63F8 или 63F8.001. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2729, 2730, 2731 или 2732 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555, или другую легкую цепь 64D7 или 64D7.001.

[0241] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающего белка антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, ингибирует связывание TREM-1 с лигандом TREM-1.

[0242] В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с N-концом антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с N- и С-концами

антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления фрагмент IL-10 слит во внутреннем сайте в антигенсвязывающем фрагменте, например фрагмент IL-10 слит между доменом СН1 и шарнирными областями тяжелой цепи или в сайтах, описанных в патенте США № 8008453, включенном в данный документ посредством ссылки. В различных вариантах осуществления по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с тяжелой и/или легкой цепью антигенсвязывающего фрагмента. В различных вариантах осуществления тяжелая цепь и/или легкая цепь представляет собой модифицированную или сконструированную тяжелую цепь или легкую цепь.

Молекулы нуклеиновой кислоты

[0243] Настоящее изобретение также предусматривает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие мутеины IL-10, антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, как описано в данном документе, что включает, например, последовательность мутеина IL-10, легкую цепь антигенсвязывающего белка, переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи, тяжелую цепь антигенсвязывающего белка, переменную область тяжелой цепи, константную область тяжелой цепи, линкеры, слитые белки, а также любые и все их компоненты и комбинации. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению включают нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере около 90%, более предпочтительно по меньшей мере около 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 98% гомологией с нуклеиновыми кислотами по настоящему изобретению. Термины "процент сходства", "процент идентичности" и "процент гомологии" при ссылке на конкретную последовательность используются, как указано в программном обеспечении GCG® Университета Висконсина. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также включают комплементарные нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях последовательности будут полностью комплементарными (без ошибочных спариваний) при выравнивании. В других случаях в последовательностях может присутствовать до приблизительно 20% ошибочных спариваний. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела по настоящему изобретению.

[0244] Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть клонированы в вектор, такой как плаزمид, космид, бакмид, фаг, искусственная хромосома (BAC, YAC) или вирус, в которые могут быть вставлены другая генетическая последовательность или элемент (ДНК или РНК), таким образом, чтобы обеспечить репликацию присоединенной последовательности или элемента. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии содержит сегмент конститутивно активного промотора (такого как без ограничения CMV, SV40, фактор элонгации или последовательность LTR) или последовательность индуцибельного промотора, такого как индуцируемый стероидом вектор pIND (Invitrogen), таким образом, что экспрессию нуклеиновой кислоты можно регулировать. Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут дополнительно

содержать регуляторные последовательности, например, внутренний сайт связывания рибосомы. Например, вектор экспрессии можно вводить в клетку с помощью трансфекции.

[0245] Также предусмотрен вектор экспрессии, содержащий следующие функционально связанные элементы: промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин IL-10, тяжелую цепь антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению или слитый белок; вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и терминатор транскрипции. В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор экспрессии, содержащий следующие функционально связанные элементы: первый промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин IL-10, тяжелую цепь антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению или слитый белок на их основе; первый терминатор транскрипции; необязательно второй промотор транскрипции, вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и второй терминатор транскрипции.

[0246] Секреторная последовательность сигнального пептида также может, необязательно, кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательности сигнального пептида могут быть присоединены/слиты с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или слитого белка, описанных в данном документе.

[0247] Также предусмотрены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие такие векторы и экспрессирующие мутеин IL-10, тяжелые и легкие цепи антигенсвязывающего белка или антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10. Рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, например клетку *E. coli*, или эукариотическую клетку, например клетку млекопитающего или клетку дрожжей. Клетки дрожжей включают клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Pichia pastoris*. Клетки млекопитающих включают клетки VERO, HeLa, яичника китайского хомяка (CHO), W138, почки детеныша хомяка (BHK), COS-7, MDCK, линию 293 эмбриональных клеток почки человека, линии нормальных клеток почки собаки, линии нормальных клеток почки кошки, клетки почки обезьяны, клетки почек африканской зеленой обезьяны, клетки COS и нетуморигенные клетки мышинных миобластов G8, линии клеток фибробластов, линии клеток миеломы, мышинные клетки NIH/3T3, клетки LMTK31, клетки Сертоли мыши,

клетки цервикальной карциномы человека, клетки печени крыс породы буффало, клетки легкого человека, клетки печени человека, опухолевые клетки молочной железы мыши, клетки TRI, клетки MRC 5 и клетки FS4. Рекомбинантные клетки, продуцирующие белок, по настоящему изобретению также включают любую известную линию клеток экспрессии насекомых, таких как, например, клетки *Spodoptera frugiperda*. В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих. В определенном варианте осуществления клетки млекопитающих представляют собой клетки СНО.

[0248] Способы очистки белков известны из уровня техники, и их применяют в данном документе для выделения рекомбинантных белков из сред для культивирования клеток. Например, способы очистки белков и антител известны из уровня техники, и их можно применять при получении антител по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы для очистки белков и антител включают фильтрацию, аффинную колоночную хроматографию, катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию и концентрацию. Стадия фильтрации может включать ультрафильтрацию и необязательно ультрафильтрацию и диафильтрацию. Фильтрацию предпочтительно осуществляют по меньшей мере приблизительно 5-50 раз, более предпочтительно от 10 до 30 раз и наиболее предпочтительно 14-27 раз. Аффинную колоночную хроматографию можно осуществлять с применением, например, аффинной хроматографии PROSEP® (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США). В различных вариантах осуществления стадия аффинной хроматографии включает колоночную хроматографию PROSEP®-vA. Элюат можно промывать растворителем-детергентом. Катионообменная хроматография может включать, например, катионообменную хроматографию SP-Sepharose. Анионообменная хроматография может включать, например, без ограничения анионный обмен с быстрым потоком Q-Sepharose. Стадия обмена аниона предпочтительно является не связывающей, что позволяет удалить отходы, включая ДНК и BSA. Продукт, представляющий собой антитело, предпочтительно нанофильтруют, например, с использованием нанофильтра Pall DV 20. Продукт, представляющий собой антитело, можно концентрировать, например, с применением ультрафильтрации и диафильтрации. Способ может дополнительно включать стадию эксклюзионной хроматографии для удаления агрегатов.

[0249] В различных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 11-18, являются применимыми для экспрессирования мутеинов IL-10 в данном документе или их фрагментов или их вариантов.

[0250] В некоторых вариантах осуществления разные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела, специфичного в отношении мишени. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела, специфичного в отношении мишени. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует антитело, специфичное в отношении

мишени, по настоящему изобретению, а также любые из полипептидов, кодируемые нуклеиновыми кислотами, описанными в данном документе.

[0251] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VH, которая на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности VH, изложенной под SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в очень жестких условиях, таких как таковые, описанные в данном документе, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186, или которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, под любым из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

[0252] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VL, которая на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности VL, изложенной под SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в очень жестких условиях, таких как таковые, описанные в данном документе, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185, или которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, по любому из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183.

[0253] В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VL антигенсвязывающих белков, связывающих TREM-1, изложенную в данном документе, или ее часть. В родственном аспекте аминокислотная последовательность VL представляет собой консенсусную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность CDR легкой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанная часть представляет собой непрерывную часть, содержащую LCDR1-CDR3. В родственном аспекте аминокислотные последовательности LCDR1-3 представляют собой консенсусные последовательности. В одном варианте осуществления указанная часть содержит по меньшей мере одну, две или три из области CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи, необязательно с отличным

человеческим или человеческим консенсусным каркасом и необязательно с 1, или не более чем с 2, или не более чем с 3 мутациями в совокупности в 3 CDR.

[0254] В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VH антигенсвязывающих белков, связывающих TREM-1, изложенную в данном документе, или ее часть. В родственном аспекте аминокислотная последовательность VH представляет собой консенсусную последовательность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность CDR тяжелой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанная часть представляет собой непрерывную часть, содержащую HCDR1-CDR3. В родственном аспекте аминокислотные последовательности HCDR1-3 представляют собой консенсусные последовательности. В одном варианте осуществления указанная часть содержит по меньшей мере одну, две или три из области CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи, необязательно с отличным человеческим или человеческим консенсусным каркасом и необязательно с 1, или не более чем с 2, или не более чем с 3 мутациями в совокупности в 3 CDR.

[0255] Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие определенные тяжелые и легкие цепи антигенсвязывающего белка, изложены под SEQ ID NO: 303-526 (бивалентные) и SEQ ID NO: 527-862 (моновалентные). Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариантные переменные области тяжелой цепи антитела к TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 2012, 2014, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052, 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086, 2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120, 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, и 2136, и нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантные переменные области легкой цепи антитела к TREM-1, изложены под SEQ ID NO: 2234, 2236, 2238, 2240, 2242, 2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256, 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290, 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324, 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, и 2358.

[0256] В иллюстративных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит легкую каппа-цепь (κ) человека или лямбда-цепь (λ) человека, или аминокислотную последовательность, полученную из них, или тяжелую цепь человека, или последовательность, полученную из нее, или обе из тяжелой и легкой цепей совместно в одной цепи, в димерной, тетрамерной или другой форме.

Линкеры

[0257] Линкеры или спейсеры включают пептиды или другие фрагменты, которые применяют для соединения двух молекул посредством ковалентных или нековалентных связей. Пептидные фрагменты предусмотрены в данном документе в пределах

полипептидов мутеина IL-10 с целью обеспечения стабильности и увеличения расстояния для последовательности IL-10 для надлежащего сворачивания в мономерной форме. Пептидные фрагменты также предусмотрены в данном документе для применения в антигенсвязывающих белках по настоящему изобретению, при этом они обеспечивают соединение или спейсер между антигенсвязывающим фрагментом в антигенсвязывающем белке и мономером/мутеином IL-10, с которым он слит.

[0258] Пептидный линкер, соединяющий Fc-область с мутеином IL-10, может представлять собой любой из пептидных линкеров, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления длина линкера может составлять 2-40, 3-40, 3-30 или 3-20 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера может составлять 3-25, 4-18, 4-20, 5-20, 6-18 или 10-20 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера может составлять приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет 4-18 аминокислот. В определенных вариантах осуществления длина пептидного линкера, соединяющего Fc-область с мутеином IL-10, составляет по меньшей мере 4 аминокислоты, по меньшей мере 5 аминокислот или по меньшей мере 6 аминокислот. В других вариантах осуществления длина пептидного линкера, соединяющего Fc-область с карбоксиконцевым Fab-фрагментом, составляет по меньшей мере 8 аминокислот.

[0259] В некоторых вариантах осуществления линкер может быть присоединен к С-концу тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента в антигенсвязывающем белке. В различных вариантах осуществления линкер представляет собой 3-мер, 4-мер, 5-мер, 6-мер, 7-мер, 8-мер или повторяющийся 3-, 4-, 5- или 6-мер. Иллюстративные линкеры включают Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2677), Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2705), Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 2706), Gly-Gly-Gly-Gln (SEQ ID NO: 2707), Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2708), Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2725), (Gly₃Ser)₂ (SEQ ID NO: 2709), (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 2710), (Gly₃Ser)₃ (SEQ ID NO: 2711), (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 2712), (Gly₃Ser)₄ (SEQ ID NO: 2713), (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 2714), (Gly₃Ser)₅ (SEQ ID NO: 2715), (Gly₄Ser)₅ (SEQ ID NO: 2716), (Gly₃Ser)₆ (SEQ ID NO: 2717), (Gly₄Ser)₆ (SEQ ID NO: 2718), Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-His-Leu (SEQ ID NO: 2719), Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-His-Leu (SEQ ID NO: 2720), Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-His-Leu (SEQ ID NO: 2721), Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ala-SeGGGr-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2722), а также линкеры, изложенные в примерах.

[0260] Линкерные или спейсерные пептидные фрагменты также вставлены в мутеин IL-10 для стабильности. Например, последовательность из 4-8 аминокислот может быть добавлена в пределах петли спирали DE IL-10 дикого типа или мутеина IL-10. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот. В различных вариантах осуществления длина линкера составляет 6

аминокислот. В различных вариантах осуществления линкер имеет последовательность GGGSGG (SEQ ID NO: 2676).

Производные

[0261] Подходящие выявляемые молекулы могут быть непосредственно или опосредовано присоединены к мутеинам IL-10, антигенсвязывающим белкам или слитым белкам по настоящему изобретению. Подходящие выявляемые молекулы включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные маркеры, хемилюминесцентные маркеры, магнитные частицы и т. п. Для опосредованного присоединения выявляемой или цитотоксической молекулы выявляемую или цитотоксическую молекулу можно конъюгировать с членом комплементарной/анти-комплементарной пары, при этом другой член связан с частью связывающего полипептида или антитела. Типичной комплементарной/анти-комплементарной парой для этих целей является биотин/стрептавидин.

[0262] Мутеины IL-10, антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10 по настоящему изобретению, также включают производные, которые являются модифицированными, например, посредством ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не предупреждает связывание антитела с его эпитопом. Примеры подходящих производных включают без ограничения производные, которые являются фукозилированными, гликозилированными, ацетилированными, пэгилированными, фосфорилированными или амидированными. Сами мутеины IL-10, антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, а также их производные по настоящему изобретению могут быть дериватизированы с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связи с клеточным лигандом или другими белками и т. п. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна тяжелая цепь мутеина IL-10, или антигенсвязывающего белка, или антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, является пэгилированной. В некоторых вариантах осуществления пэгилирование осуществляется путем N-присоединения или присоединения через боковую цепь аминокислоты (например, лизина).

[0263] Гликозилирование может способствовать эффекторной функции антител, в частности антител IgG1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мутеины IL-10, антигенсвязывающие белки или антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые влияют на уровень или тип гликозилирования связывающих белков. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X

представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров - N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы - к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также может применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

[0264] В определенных вариантах осуществления степень гликозилирования мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков и антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, повышается путем добавления одного или нескольких сайтов гликозилирования, например, к Fc-области связывающего белка. Добавление сайтов гликозилирования к антигенсвязывающему белку может быть с удобством осуществлено путем модификации аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять посредством добавления одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в исходную последовательность или замены на них (в случае сайтов О-связанного гликозилирования). Для ясности, аминокислотная последовательность антигенсвязывающего белка может быть изменена посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях, так что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

[0265] Настоящее изобретение также охватывает получение мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков и антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, с измененной структурой углеводов, что приводит в результате к измененной эффекторной активности, включая антигенсвязывающие белки с отсутствующим или пониженным фукозилированием, которые проявляют улучшенную активность ADCC. Из уровня техники известны различные способы снижения или устранения фукозилирования. Например, эффекторная активность ADCC опосредуется связыванием молекулы антитела с рецептором FcγRIII, который, как было показано, зависит от углеводной структуры N-связанного гликозилирования остатка N297 домена CH2. Нефукозилированные антитела связывают этот рецептор с повышенной аффинностью и запускают эффекторные функции, опосредованные FcγRIII, более эффективно, чем нативные фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное получение нефукозилированного антитела в клетках линии СНО, в которых фермент альфа-1,6-фукозилтрансфераза был нокаутирован, приводит к получению антитела со 100-кратно повышенной активностью ADCC (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87(5):614-22, 2004). Подобные эффекты могут быть достигнуты посредством снижения активности фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы или других

ферментов в пути фукозилирования, например, посредством обработки с помощью siRNA или антисмысловой РНК, конструирования линий клеток для нокаута фермента(-ов) или культивирования с селективными ингибиторами гликозилирования (см. Rothman et al., Mol Immunol. 26(12):1113-23, 1989). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например, Lec13 или линия клеток гибридомы YB2/0 крысы, естественным путем продуцируют антитела с более низкими уровнями фукозилирования (см. Shields et al., J Biol Chem. 277(30):26733-40, 2002 и Shinkawa et al., J Biol Chem. 278(5):3466-73, 2003). Также было установлено, что повышение уровня разветвленного углевода, например посредством рекомбинантного продуцирования антитела в клетках, которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII, также повышает активность ADCC (см. Umana et al., Nat Biotechnol. 17(2):176-80, 1999).

[0266] В других вариантах осуществления гликозилирование мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков и антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанных в данном документе, снижается или устраняется путем удаления одного или нескольких сайтов гликозилирования, например, из Fc-области связывающего белка. Аминокислотные замены, которые исключают или модифицируют N-связанные сайты гликозилирования, могут уменьшать или исключать N-связанное гликозилирование антигенсвязывающего белка. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат мутацию в положении N297 (нумерация EU), такую как N297Q, N297A или N297G. В одном конкретном варианте осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат Fc-область из человеческого антитела IgG1 с мутацией N297G. Для улучшения стабильности молекул, содержащих мутацию N297, Fc-область молекул может быть дополнительно сконструирована. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в Fc-области заменены на цистеин для содействия образованию дисульфидной связи в димерном состоянии. Таким образом, остатки, соответствующие V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 (нумерация EU) Fc-области IgG1, могут быть замещены цистеином. В одном варианте осуществления конкретные пары остатков заменены на цистеин таким образом, что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предотвращая скремблирование дисульфидных связей. В определенных вариантах осуществления пары включают без ограничения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, а также V323C и I332C. В конкретных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат Fc-область из человеческого антитела IgG1 с мутациями R292C и V302C. В таких вариантах осуществления Fc-область также может содержать мутацию N297G.

[0267] Также могут быть необходимы модификации мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков и антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, по настоящему изобретению для увеличения периода полужизни в сыворотке крови, например, посредством включения

или добавления эпитопа, связывающего рецептор реутилизации (например, посредством мутации в соответствующей области или посредством включения эпитопа в пептидную метку, которая затем сливается с мутеинами IL-10, антигенсвязывающими белками и антигенсвязывающими белками, содержащими антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, на любом конце или в середине, например, посредством синтеза ДНК или пептида; см., например, WO96/32478), или добавления молекул, таких как PEG или другие водорастворимые полимеры, включая полисахаридные полимеры. Эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, предпочтительно состоит из области, где любые один или несколько аминокислотных остатков из одной или двух петель Fc-области переносятся в аналогичное положение антигенсвязывающего белка. В одном варианте осуществления переносятся три или более остатков из одной или двух петель Fc-области. В одном варианте осуществления, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области (например, Fc-области IgG) и перенесен в область CH1, CH3 или VH, или в более чем одну такую область, мутеинов IL-10, антигенсвязывающего белка и антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10. В качестве альтернативы, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области и перенесен на область CL или область VL или обе эти области антигенсвязывающего белка. См. международные заявки WO 97/34631 и WO 96/32478 в отношении описания вариантов Fc и их взаимодействия с рецептором реутилизации.

[0268] Мутеины IL-10, антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, по настоящему изобретению включают варианты, содержащие одну или множество аминокислотных замен, делеций, добавлений или замещений, которые сохраняют их биологические свойства. Специалист в данной области может получить варианты, содержащие одну или множество аминокислотных замен, делеций, добавок или замещений. Такие варианты могут включать, среди прочего: (а) варианты, где один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, где одна или несколько аминокислот добавлены или удалены из полипептида, (с) варианты, где одна или несколько аминокислот включают замещающую группу, и (d) варианты, где полипептид слит с другим пептидом или полипептидом, например, партнером по слиянию, белковой меткой или другим химическим фрагментом, которые могут придавать полезные свойства полипептиду, такими как, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, биотинный фрагмент и т. п. Антитела и биспецифические антитела по настоящему изобретению могут включать варианты, где аминокислотные остатки от одного вида заменены соответствующим остатком для другого вида в консервативных либо неконсервативных положениях. В другом варианте осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях заменены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (подавление, делеции, мутации и т. д.), химические и ферментативные методики, известны специалисту в данной области.

Способы лечения

[0269] IL-10 действительно ингибирует выработку воспалительных цитокинов, таких как $\text{TNF}\alpha$ и IL-23, в миелоидных клетках. Как $\text{TNF}\alpha$, так и IL-23 являются подтвержденными мишенями для лечения воспалительного заболевания кишечника. IL-10 также осуществляет супрессию антигенпрезентирующих клеток, включая ингибирование индукции МНСII, CD86 и ICAM1. IL-10 также активирует CD8⁺ Т-клетки и В-клетки, хотя при более высокой EC50, что, вероятно, вносит вклад в дозолимитирующую токсичность IL-10 в клиническом исследовании. rhIL-10 характеризуется плохой PK ($t_{1/2}=2,5-4$ ч) и не был способен достичь селективности в отношении типа клеток при клиническом применении. Высокие дозы rhIL-10 стимулируют CD8⁺ Т-клетки и В-клетки, в то время как низкие дозы демонстрируют недостаточный охват тканей и миелоидных клеток. У мышей с КО специфического для миелоидных клеток IL-10R1 развивается колит, сходный с таковым для мышей с КО IL-10, что позволяет предположить, что ингибирование IL-10 миелоидных клеток является достаточным для лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD) (Zigmond et al., Immunity 40(5):720-33, 2014). Таким образом, в данном документе выдвигается гипотеза, что нацеливание IL-10 на миелоидные клетки путем биспецифического подхода с использованием mAb к TREM-1/мутеина IL-10 или другого нацеливающего фрагмента могло бы достигать достаточной противовоспалительной активности в отношении миелоидных клеток без стимулирующих видов активности в отношении CD8⁺ клеток и В-клеток.

[0270] У пациентов-людей с гомозиготными мутациями с потерей функции IL-10, IL-10R1 или IL-10R2 развивалась тяжелая младенческая форма (Kotlarz et al., Gastroenterology, 143: 347-355, 2012; Glocker, NEJM, 61(21):2033-45, 2009). IL-10 находится среди генетических мутаций, ассоциированных с IBD (локусы GWAS, rs3024505 RAF 0,16 или 1,46, p-значение 10^{-42} , Jostins et al., Nature 491:119-124, 2012, deCODE rs3024505 IBD или 1,13, p-значение 0,024).

[0271] Триггерный рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках (TREM1, TREM-1), является членом семейства Ig, экспрессируемым на нейтрофилах, моноцитах и макрофагах. Ингибирование TREM-1 может являться необходимым для лечения IBD, поскольку мыши с КО TREM-1 являются жизнеспособными и защищены от развития колита DSS и колита, обусловленного переносом Т-клеток (Weber, PLoS Pathog, 10(1):1003900, 2014). Лечение с помощью слияния TREM-1-Fc улучшало выживаемость и снижало индукцию $\text{TNF}\alpha$ после провокации LPS у мышей (Bouchon, Nature, 410:1103-7, 2001). TREM-1 характеризуется повышенным уровнем экспрессии в воспаленных тканях при IBD (Schenk et al., J Clin Invest, 117:3097-3106, 2007), повышенным уровнем экспрессии в макрофагах толстой кишки у мышей CX3CR1^{cre}IL10R1^{fl/fl} (Zimond, Immunity, 40(5):720-33, 2014), а также связывается с DAP12 и индуцирует фосфорилирование Syk при активации. В данном документе выдвигается гипотеза, что TREM-1 служит в качестве желательного партнера для нацеливания для антигенсвязывающего белка на основе IL-10 вследствие его высокого уровня экспрессии на поверхности миелоидной клетки.

[0272] Согласно недавним сообщениям, PGLYRP1 (белок распознавания пептидогликана 1) является лигандом для TREM-1 (Read, J. Immunol. 194: 1417-1421, 2015), и другие возможные лиганды еще предстоит определить. Сообщалось, что антитело к TREM-1 снижает секрецию воспалительных цитокинов из клеток собственной пластинки слизистой оболочки кишечника, выделенных от пациентов с IBD, подвергавшихся стимуляции с помощью агониста TREM-1 PGLYRP-1/пептидогликана (Brynjolfsson et al., Inflamm Bowel Dis 22(8):1803-11, 2016).

[0273] Показатели эффективности видов лечения при IBD включают оценку варианта риска IBD rs3024505 IL-10 в регуляции экспрессии IL-10, оценку гетерогенности уровней IL-10 в сыворотке крови и тканях пациента с IBD, а также оценку возможной корреляции со степенью тяжести заболевания, ответами на виды терапии для вариантов риска IBD.

[0274] Дополнительные измерения для определения эффективности включают снижение IL-10-индуцированного профиля экспрессии в миелоидных клетках и тканях IBD, анализ гетерогенности цитокинов, полученных из миелоидных клеток, подвергнутых подавлению с помощью IL-10 (например, TNF α , IL-23), в образцах IBD, а также определение гетерогенности и количества моноцитов и количества макрофагов в воспаленных тканях IBD. Предусматривается, что виды лечения в данном документе с помощью мутеина IL-10 или антигенсвязывающих белков будут сохранять подавление активности миелоидных клеток и устранять обусловленную IL-10 активацию CD8⁺ Т-клеток и В-клеток. Предусматривается, что лечение обуславливает снижение уровней воспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-23, у субъекта.

[0275] Предусматривается, что лечение с помощью антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, или антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, по настоящему изобретению, предусматривающее белок, связывающий TREM-1, обеспечивает снижение уровня экспрессии TREM-1 в воспалительных клетках.

[0276] Болезнь Крона включает аномальное воспаление любой части пищеварительного тракта от ротовой полости до ануса, хотя у большинства пациентов аномальное воспаление ограничено подвздошно-ободочной областью, тонким кишечником и ободочно-аноректальной областью. Как правило, воспаление является прерывистым. Часто встречающиеся симптомы включают боль в животе, снижение аппетита, потерю веса, лихорадку, диарею, ощущение распирания и/или болезненность в правом нижнем квадранте живота, запор, рвоту, а также чувство дискомфорта в перианальной области и наличие выделений. Другие возможные симптомы включают периферический артрит, задержку роста, эписклерит, афтозный стоматит, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, камни в почках, нарушение разведения и алкализацию мочи, нарушение всасывания и камни в желчном пузыре, среди прочего. См., например, Strober et al., Medical Immunology, 10th Edition, Section III, Ch. 35 (2001); Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Edition, Section 3, Ch. 31 (1999). Макрофаги,

выделенные от пациентов с болезнью Крона, вырабатывают повышенные количества IL-12, IFN γ , TNF α и других воспалительных цитокинов.

[0277] Язвенный колит отличается от болезни Крона по нескольким аспектам. Во-первых, он, как правило, ограничивается толстым кишечником, в то время как болезнь Крона может возникать на протяжении пищеварительного тракта. Во-вторых, язвенный колит в основном предусматривает воспаление только поверхностных слоев кишечника, в отличие от болезни Крона, где воспаление может проникать на всю толщину стенки кишечника или другой локализации в пищеварительном тракте. Наконец, язвенный колит, как правило, предусматривает непрерывную область воспаления, в отличие от прерывистых участков воспаления, характерных для болезни Крона. Подобно болезни Крона, язвенный колит наблюдается преимущественно на городских территориях. Кроме того, генетические факторы, вероятно, играют роль при язвенном колите, поскольку отмечается семейная группировка случаев. Аутоантитела наблюдаются у пациентов с язвенным колитом более часто, чем у пациентов с болезнью Крона. Аутоантитела часто направлены на компоненты эпителиальных клеток толстого кишечника. Среди наиболее часто встречающихся отмечаются антинейтрофильные цитоплазматические антитела со специфичностью к каталазе, α -энолазе и лактофerrину. В некоторых случаях такие антитела вступают в перекрестную реакцию с микроорганизмами толстого кишечника.

[0278] В клинических исследованиях активность болезни Крона часто оценивают в баллах с применением Индекса активности болезни Крона (CAI). CAI обеспечивает балльную оценку активности заболевания, основанную на восьми факторах, включающих (1) количество дефекаций жидким или неоформленным стулом в день, (2) оценку пациентом степени боли в животе в день, (3) оценку пациентом общего самочувствия, (4) сообщение пациентом о наличии других симптомов, включая артрит, ирит, увеит, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, афтозный стоматит, трещину анального отверстия, фистулу или абсцесс, другую фистулу или лихорадку, (5) сообщение пациентом о приеме ломотила или других опиатов по поводу диареи, (6) наличие опухолевидного образования в животе, (7) гематокрит и (8) вес тела. См., например, Best et al. (1976), Gastroenterol. 70: 439-444, релевантные части которой включены в данный документ посредством ссылки.

[0279] Симптомы язвенного колита многообразны. Они могут включать диарею, тенезмы, схваткообразные боли в животе, кровь и слизь в стуле, лихорадку и кровотечение из прямой кишки. Также может возникать токсический мегаколон, потенциально угрожающее жизни состояние, при котором толстая кишка расширена на более чем приблизительно 6 сантиметров и может утрачивать свой мышечный тонус и/или перфорироваться. Другие симптомы, которые могут сопровождать язвенный колит, включают периферический артрит, анкилозирующий спондилит, сакроилеит, передний увеит, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, эписклерит, аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит, цирроз и задержку роста и развития у детей.

[0280] В некоторых вариантах осуществления пациента, страдающего воспалительным заболеванием кишечника (IBD), таким как болезнь Крона или язвенный колит, можно лечить с помощью мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, или другого антигенсвязывающего белка, или антигенсвязывающего белка, содержащего IL-10, раскрытого в данном документе, до, после или одновременно с лечением с помощью существующей терапии для IBD. Существующие терапевтические средства для лечения IBD включают, например, сульфасалазин, 5-аминосалициловую кислоту и ее производные (такие как олсалазин, балсалазид и месаламин), антитела к TNF (включая инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пэгол), кортикостероиды для перорального или парентерального введения (включая преднизон, метилпреднизон, будесонид или гидрокортизон), адренокортикотропный гормон, антибиотики (включая метронидазол, цiproфлоксацин или рифаксимин), азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, такролимус и талидомид.

[0281] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ ингибирования одного или нескольких провоспалительных цитокинов, например TNF α , у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка или антитела по настоящему изобретению или слитого белка, описанного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. Способ можно применять для лечения нарушения, характеризующегося повышением экспрессии или активности TNF α . Мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающие белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, можно вводить с другим фармацевтическим средством, либо в одном и том же составе, либо по отдельности.

[0282] Ревматоидный артрит (RA) представляет собой хроническое заболевание с системными симптомами, а также с симптомами, связанными конкретно с суставами. Симптомы часто включают синовит, приводящий к боли и отечности суставов, а также отклонения различных лабораторных показателей от нормы, например превышающие норму уровни ревматоидного фактора, антител к модифицированному белку цитруллина (антитела к CCP) и С-реактивного белка (CRP), а также повышение скорости оседания эритроцитов (ESR). Менее часто встречающиеся симптомы включают различные внесуставные симптомы, предусматривающие, например, сухожилия, связки, кровеносные сосуды, сердце и легкие. Активность заболевания часто можно измерить с применением ряда индексов. См., например, Anderson et al. (2012), *Arthritis Care & Res.* 64(5): 640-647, части которой, в которых описаны такие индексы, включены в данный документ посредством ссылки. Элементы, включенные в такие расчетные индексы, включают количество суставов, болезненных при пальпации, количество отечных

суставов, результаты функциональных исследований и результаты различных лабораторных исследований, таких как CRP, ESR и т. д.

[0283] В некоторых вариантах осуществления пациента, страдающего RA, можно лечить с помощью мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, или другого антигенсвязывающего белка описанного в данном документе, или антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, раскрытых в данном документе, до, после или одновременно с лечением с помощью лекарственного средства, применяемого для лечения RA в настоящее время. Терапевтические средства, в настоящее время используемые для лечения ревматоидного артрита (RA), включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) (такие как аспирин и ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2)), модифицирующие заболевание противовоспалительные лекарственные средства (DMARD, такие как метотрексат, лефлуномид и сульфасалазин), противомаларийные средства (такие как гидроксихлорохин), циклофосфамид, D-пеницилламин, азатиоприн, соли золота, ингибиторы фактора некроза опухоли (такие как этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пэгол), ингибиторы CD20, такие как ритуксимаб, антагонисты IL-1, такие как анакинра, ингибиторы IL-6, такие как тоцилизумаб, ингибиторы янус-киназ (JAK, такие как тофацитиниб), абатацепт и кортикостероиды, среди прочего.

[0284] Дополнительно предусматривается, что комбинация мутеина IL-10, мутеин IL-10 с антигенсвязывающим белком, либо в отдельной композиции, либо в виде слитого белка, повышает терапевтический индекс (ТИ) IL-10 в качестве противовоспалительного лекарственного средства. В различных вариантах осуществления ТИ мутеина IL-10 повышается в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или больше при введении по отдельности или в комбинации с антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению.

[0285] В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 снижает степень подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8+ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках при одновременном снижении уровня активации CD8+ Т-клеток и В-клеток.

[0286] В определенных вариантах осуществления измерение супрессии TNF- α выполняют с применением выделенных PBMC. PBMC выделяют из крови субъекта (человека, мыши, крысы, яванского макака и т. п.), стимулируют *in vitro* с помощью LPS, и определяют уровни TNF α до и после стимуляции и в присутствии разных тестируемых молекул с применением, например ELISA ALPHALISA или набора для выявления TNF α MSD Vplex.

[0287] В определенных вариантах осуществления измерение активации CD8⁺ Т-клеток и /или В-клеток выполняют с применением анализа цельной крови. Цельную кровь выделяют от субъекта, стимулируют *in vitro* в присутствии разных тестируемых молекул, и определяют уровни стимуляции CD8⁺ Т-клеток или уровни активации В-клеток, например, посредством выявления уровней pSTAT3 в образцах посредством анализа FACS.

Введение и дозирование

[0288] Способы по настоящему изобретению включают стадию введения фармацевтической композиции, содержащей мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой стерильную композицию.

[0289] Количества терапевтической композиции в данной дозе могут варьироваться в зависимости от размера тела индивидуума, которому вводят средство терапии, а также от характеристик нарушения, подвергаемого лечению.

[0290] Настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, может быть составлена в соответствии с известными способами для получения фармацевтически применимых композиций, где терапевтические антитела комбинируют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Говорят, что композиция содержит "фармацевтически приемлемый носитель", если ее введение может переноситься пациентом-реципиентом. Стерильный буферизованный фосфатом солевой раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие носители хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Getman), ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company (1995).

[0291] Для фармацевтического применения полипептиды по настоящему изобретению составляют для парентеральной, в частности, внутривенной или подкожной, доставки в соответствии с традиционными способами. Внутривенное введение может осуществляться путем болюсной инъекции, контролируемого высвобождения, например с применением минипомп или другой подходящей технологии, или путем инфузии, обычно на протяжении периода от одного до нескольких часов. В целом, фармацевтические составы будут включать мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий фрагмент, связывающий TREM-1, и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, в комбинации с

фармацевтически приемлемым носителем, таким как солевой раствор, буферный солевой раствор, 5% декстроза в воде или т. п. Составы могут дополнительно включать одно или несколько вспомогательных веществ, консервантов, солюбилизаторов, буферных средств, альбумин для предупреждения потери белка на поверхностях флакона и т. д. При применении такой комбинированной терапии мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий фрагмент, связывающий TREM-1, и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, можно комбинировать в одном составе или можно вводить в отдельных составах. Способы составления хорошо известны из уровня техники и раскрыты, например, в Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa. (1990), которая включена в данный документ посредством ссылки. Терапевтические дозы, как правило, будут находиться в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг веса пациента в сутки, предпочтительно 0,5-20 мг/кг в сутки, при этом точная доза определяется клиницистом в соответствии с принятыми стандартами с учетом природы и степени тяжести состояния, подлежащего лечению, характеристик пациента и т. д. Определение дозы находится в пределах уровня компетенции специалиста в данной области. Чаще всего антитела будут вводить в течение одной недели или меньше, часто в течение периода от одного до трех дней. Как правило, доза вводимых антител будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст, вес, рост, пол, общее состояние здоровья и медицинский анамнез пациента. Как правило, необходимо вводить реципиенту дозу антител, которая находится в диапазоне от приблизительно 1 пг/кг до 10 мг/кг (количество средства/вес тела пациента), хотя также можно вводить более низкую или более высокую дозу, если это диктуется обстоятельствами.

[0292] Введение субъекту мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка или антитела по настоящему изобретению или антигенсвязывающего белка, содержащего антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, можно осуществлять внутривенным, внутриаартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривентральным, интратекальным путем, посредством перфузии через регионарный катетер или посредством прямой инъекции в очаг поражения. В различных вариантах осуществления введение осуществляют внутривенным или подкожным путем. При введении мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков или антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, посредством инъекции введение можно осуществлять посредством непрерывной инфузии или посредством однократной или многократных болюсных инъекций.

[0293] Дополнительные пути введения включают пероральный, через слизистую оболочку, легочный и чрескожный. Пероральная доставка подходит для полиэфирных микросфер, зеиновых микросфер, протеиноидных микросфер, полицианоакрилатных микросфер и систем на основе липидов (см., например, DiBase et al., "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", в Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 255-288, Plenum Press (1997)). Осуществимость интраназальной доставки проиллюстрирована

посредством такого режима введения инсулина (см., например, Hinchcliffe et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35:199 (1999)). Сухие или жидкие частицы, содержащие антитела по настоящему изобретению, можно получать и вводить ингаляционным путем с помощью распылителей для сухого порошка, генераторов аэрозоля жидких частиц или небулайзеров (например, Pettit et al., *TIBTECH*, 16:343 (1998); Patton et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35:235 (1999)). Этот подход иллюстрируется системой контроля диабета AERX®, которая представляет собой ручной электронный ингалятор, доставляющий аэрозольный инсулин в легкие. Результаты исследований показали, что белки размером 48000 кДа доставлялись через кожу в терапевтических концентрациях с помощью низкочастотного ультразвука, что иллюстрирует осуществимость чрескожного пути введения (Mitragotri et al., *Science*, 269:850 (1995)).

[0294] Для целей терапии композиции, содержащие мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. Говорят, что комбинацию мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка или антитела по настоящему изобретению или антигенсвязывающего белка, содержащего антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемого носителя вводят в "терапевтически эффективном количестве", если вводимое количество является физиологически значимым. Средство является физиологически значимым, если его присутствие приводит к выявляемому изменению физиологии пациента-реципиента. Например, средство, применяемое для лечения воспаления, является физиологически значимым, если его присутствие смягчает воспалительный ответ. Эффективное лечение можно оценивать различными способами. В одном варианте осуществления эффективное лечение определяют по уменьшению воспаления. В других вариантах осуществления эффективное лечение отмечают по ингибированию воспаления. В еще других вариантах осуществления эффективную терапию измеряют по улучшению самочувствия пациента, включая такие признаки, как увеличение массы тела, восстановление силы, уменьшение боли, прогрессирующее улучшение и субъективные ощущения пациента, свидетельствующие об улучшении состояния здоровья.

[0295] Количества мутеина IL-10 в данной дозе могут варьироваться в зависимости от размера тела индивидуума, которому вводят средство терапии, а также от характеристик нарушения, подвергаемого лечению. Доза вводимого мутеина IL-10 находится в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до 1 мг/кг или от приблизительно 0,05 до 0,5 мг/кг. В различных вариантах осуществления мутеин IL-10 при слиянии с антителом к TREM-1, описанным в данном документе, находится в дозе, составляющей приблизительно 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,75 мг/кг или 1,0 мг/кг, или, если представлен в виде весового

количества, вводят в дозе, составляющей приблизительно 1,0 мкг-50 мкг или приблизительно 1,0 мкг, 3,0 мкг, 5,0 мкг, 7,5 мкг, 10 мкг.

[0296] Подразумевается, что антигенсвязывающий белок или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, например, содержащий последовательности антитела к TREM-1, вводят в дозе, составляющей 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг или больше. Мутеин IL-10 или антигенсвязывающий белок могут быть составлены в концентрации, составляющей 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 125 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл или 250 мг/мл. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или слитый белок, например, содержащий последовательности антитела к TREM-1, вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,05 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг или 5 мг/кг.

[0297] Композиции, описанные в данном документе, вводят один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в шесть месяцев.

[0298] Фармацевтическая композиция, содержащая мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, может быть представлена в жидкой форме, в виде аэрозоля или в твердой форме. Иллюстративные жидкие формы представляют собой инъекционные растворы и суспензии для перорального применения. Иллюстративные твердые формы включают капсулы, таблетки и формы с контролируемым высвобождением. Последняя форма проиллюстрирована с помощью осмотических минипомп и имплантов (Bremer et al., Pharm. Biotechnol., 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", in Ranade et al., eds., Drug Delivery Systems, pp. 95-123, CRC Press (1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", in Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 239-254, Plenum Press (1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", in Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 93-117, Plenum Press (1997).

[0299] При необходимости, композиция может дополнительно содержать более чем одно активное соединение для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно с дополняющими видами активности, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В качестве альтернативы или дополнительно, композиция может содержать средство, которое усиливает ее функцию, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибитор роста. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для заданной цели.

[0300] В одном варианте осуществления мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий

антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, вводят в составе комбинированной терапии, т. е. комбинируют с другими средствами, например терапевтическими средствами, которые являются применимыми для лечения патологических состояний или нарушений, таких как аутоиммунные нарушения и воспалительные заболевания. Термин "в комбинации" в данном контексте означает, что средства вводят по сути одновременно, параллельно или последовательно. При последовательном введении на момент начала введения второго соединения первое из двух соединений предпочтительно все еще обнаруживается в эффективных концентрациях в месте лечения.

[0301] Предусматривается, что терапевтические средства по настоящему изобретению можно вводить синхронно, в одном и том же составе. Дополнительно предусматривается, что средства вводят в отдельных составах и вводят одновременно, при этом выражение "одновременно" относится к средствам, вводимым с разницей в пределах 30 минут. Дополнительно предусматривается, что второе средство можно вводить синхронно.

[0302] В другом аспекте мутеин IL-10 вводят перед введением композиции на основе антигенсвязывающего белка. Предыдущее введение относится к введению средства в пределах одной недели до лечения с помощью другого средства, вплоть до 30 минут до введения другого средства. Дополнительно предусматривается, что средство вводят последовательно с введением других композиции или средства. Подразумевается, что последовательное введение описывает введение от 30 минут после лечения с помощью антитела вплоть до одной недели после введения антитела, например через 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 1 день, 2 дня и т. д. Дополнительно предусматривается, что второе

[0303] Например, комбинированная терапия может включать один или несколько из мутеина IL-10, антигенсвязывающего белка или антитела по настоящему изобретению или антигенсвязывающего белка, содержащего антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, составленные совместно и/или вводимые совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например одним или несколькими ингибиторами цитокинов и факторов роста, иммуносупрессорными средствами, противовоспалительными средствами, ингибиторами метаболизма, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими средствами.

[0304] Терапевтические средства, применяемые в комбинации с мутеином IL-10, антигенсвязывающим белком или антителом по настоящему изобретению или антигенсвязывающим белком, содержащим антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, включают средства, которые оказывают противодействие на различных стадиях в ходе воспалительного ответа. В одном варианте осуществления мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий

фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, такими как другие антагонисты цитокинов или факторов роста (например, растворимые рецепторы, пептидные ингибиторы, малые молекулы, слияния лигандов) или антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с другими мишенями (например, антитела, которые связываются с другими цитокинами или факторами роста, их рецепторами или другими молекулами клеточной поверхности); и противовоспалительные цитокины или их агонисты. Неограничивающие примеры средств, которые можно применять в комбинации с антителами, описанными в данном документе, включают без ограничения антагонисты одного или нескольких интерлейкинов (IL) или их рецепторов, например, антагонисты IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A-F, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23 IL-25, IL-31, IL-32, IL-33; антагонисты цитокинов или факторов роста или их рецепторов, таких как LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела по настоящему изобретению также можно комбинировать с ингибиторами, например, антителами, молекул клеточной поверхности, таких как CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (например, с ингибитором CD20 ритуксимабом (RITUXAN®), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 или их лигандов, в том числе CD154 (gp39 или CD40L) или LFA-1/ICAM-1 и VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al., *Med. Res. Rev.*, 22:146-167 (2002)). Иллюстративные антагонисты, которые можно применять в комбинации, включают антагонисты IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , IL-15, IL-18, IL-20, IL-22, IL-23 и IL-31.

[0305] В других вариантах осуществления один или несколько из мутеина IL-10, антигенсвязывающих белков или антигенсвязывающих белков, содержащих антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10 по настоящему изобретению, можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или несколькими противовоспалительными лекарственными средствами, иммуносупрессорными средствами или ингибиторами метаболизма или ферментов. Неограничивающие примеры лекарственных средств или ингибиторов, которые можно применять в комбинации с антителами, описанными в данном документе, включают без ограничения одно или несколько из нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (NSAID), например ибупрофен, тенидап, напроксен, мелоксикам, пироксикам, диклофенак и индометацин; сульфасалазин; кортикостероидов, таких как преднизолон; подавляющих цитокины противовоспалительных лекарственных средств (CSAID); ингибиторов биосинтеза нуклеотидов, например ингибиторов биосинтеза пурина, антагонистов фолиевой кислоты (например, метотрексат(N-[4-[[[(2,4-диамино-6-птеридинил)метил]метиламино]бензоил]глутаминовая кислота); и ингибиторов биосинтеза пиримидина, например ингибиторов дигидрооротатдегидрогеназы (DHODH). Предпочтительные терапевтические средства для применения в комбинации с одним или несколькими антителами, например, биспецифическими антителами, по настоящему

изобретению включают NSAID, CSAID, ингибиторы (DHODH) (например, лефлуномид) и антагонисты фолиевой кислоты (например, метотрексат).

[0306] Дополнительные ингибиторы включают один или несколько из кортикостероидов (для перорального, ингаляционного применения и местных инъекций); иммуносупрессорных средств, например циклоспорина, такролимуса (FK-506); и ингибиторов mTOR, например сиролимуса (рапамицина RAPAMUNE® или производных рапамицина, например растворимых производных рапамицина (например, сложноэфирных производных рапамицина, например CCI-779); средств, которые препятствуют передаче сигнала провоспалительными цитокинами, такими как IL-1 (например, ингибиторов IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP-киназы); ингибиторов COX2, например целекоксиба, рофекоксиба и их вариантов; ингибиторов фосфодиэстеразы, например R973401 (ингибитора фосфодиэстеразы IV типа); ингибиторов фосфолипазы, например ингибиторов фосфолипазы 2 цитозоля (cPLA2) (например, аналогов трифторметилкетона); ингибиторов фактора роста клеток эндотелия сосудов или рецептора фактора роста, например ингибитора VEGF и/или ингибитора VEGF-R; и ингибиторов ангиогенеза. Предпочтительные терапевтические средства для применения в комбинации с мутеином IL-10, антигенсвязывающим белком или антителом по настоящему изобретению или антигенсвязывающим белком, содержащим фрагмент, связывающий TREM-1, и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, представляют собой иммуносупрессорные средства, например циклоспорин, такролимус (FK-506); ингибиторы mTOR, например сиролимус (рапамицин) или производные рапамицина, например растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например CCI-779); ингибиторы COX2, например целекоксиб и его варианты; и ингибиторы фосфолипазы, например ингибиторы фосфолипазы 2 цитозоля (cPLA2), например аналоги трифторметилкетона.

Наборы

[0307] Настоящее изобретение также предусматривает набор, содержащий один или несколько контейнеров, которые содержат мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанный в данном документе, оптимально в фармацевтически приемлемом носителе или композиции. Мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и фрагмент IL-10, описанные в данном документе, могут быть представлены в форме раствора для инъекций для одной или множества доз, в виде однократной дозы или в виде стерильного порошка, который будет восстановлен перед выполнением инъекции. В качестве альтернативы, такой набор может включать распылитель для сухого порошка, генератор аэрозоля жидких частиц или небулайзер для введения терапевтического(-их) средства(средств). Такой набор может дополнительно включать инструкции и письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции.

[0308] Также предусмотрены шприцы, например, одноразовые или предварительно заполненные шприцы, стерильные герметично закрытые контейнеры, например флаконы, бутылка, сосуд, и/или наборы или упаковки, содержащие любые из вышеуказанных мутеинов IL-10, антигенсвязывающих белков или антигенсвязывающего белка, содержащего фрагмент, связывающий TREM-1, и фрагмент IL-10, или композиции, необязательно с подходящими инструкциями по применению.

[0309] В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает готовое изделие или форму с однократной дозой, содержащие (a) композицию по настоящему изобретению, содержащую мутеин IL-10, антигенсвязывающий белок или антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий белок, содержащий фрагмент, связывающий TREM-1, и фрагмент IL-10, описанные в данном документе; (b) контейнер, содержащий указанную композицию; и (c) этикетку, прикрепленную к указанному контейнеру, или листок-вкладыш, включенный в указанный контейнер, в котором содержится информация касательно применения указанного антитела в лечении заболевания, связанного с иммунитетом.

[0310] В другом аспекте композиция или набор содержат дополнительный активный ингредиент, который может, например, представлять собой дополнительное антитело или противовоспалительное, цитотоксическое или другое средство, описанные в данном документе. Предпочтительно композиция является стерильной.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение мутеинов IL-10

[0311] В данном документе была выдвинута гипотеза, что мутеины IL-10, которые демонстрируют дифференциальное связывание с IL-10R1/R2 по сравнению с IL-10 дикого типа и демонстрируют дифференциальную активность стимуляции иммунной системы, будут применимы в качестве иммунотерапии.

[0312] Стабильный мономер IL-10, IL-10M1, был получен посредством вставки линкера из 6 аминокислот (GGGSGG) (SEQ ID NO: 2676) между петлями D и E из IL-10 (Josephson et al., J. Biol. Chem, 275: 13552-13557, 2000). IL-10M1 моделировали относительно структуры hIL-10/IL-10R1. 24 остатка из hIL-10 задействованы в интерфейсе связывания, и имеются две поверхности взаимодействия, сайт Ia-спираль F и петля AB из IL-10 и L2-L4 из IL-10R1, а также сайт Ib-N-конец спирали A и C-конец спирали F из IL-10, L5-L6 из IL-10R1.

[0313] Алгоритм мутагенеза IL-10 разрабатывали на основе структурного различия между вирусным IL-10 (83% гомология) и IL-10 яванского макака (супо). Для облегчения правильного сворачивания IL-10 при слиянии с получением слитого белка, например, с антителом, IL-10M1 применяли в качестве остова для схемы мутеина для обеспечения возможности для последних двух α -спиралей складываться на N-концевой глобулярный домен и образовывать функциональный мономер. Сочетание анализа структуры и последовательности, описанное ниже, применяли, чтобы помочь сфокусироваться на

возможных остатках для мутаций. Для сокращения размера панели мутеина расчеты энергии связывания $\Delta\Delta G$ применяли для определения мутаций, которые имеют наиболее дестабилизирующий эффект в отношении рецепторного интерфейса.

[0314] В алгоритме использовали последовательности, мутации и известные структуры IL-10 и IL-10/IL-10R1, фокусируясь на остатках с боковыми цепями, обращенными к интерфейсу, и максимизируя разнообразие мутаций в сайте Ib. Осуществляли скрининг одиночных точечных мутаций, однако остатки Trp, Phe, Pro (с исключениями) или Cys не подвергались мутации. Разнообразие последовательностей максимизировали посредством выбора по меньшей мере одной мутации в каждом из остатков на поверхности связывания

[0315] Дополнительные стратегии включают осуществление мутации каждого остатка в петле AB с заменой на Gly или Pro для способствования разупорядоченной конформации, выбор консервативных мутаций в петле CD, включение усечений в отношении N-концевых и C-концевых гибких петель и использование расчетов энергии (т. е. $\Delta\Delta G$ связывания) для сокращения панели мутаций.

[0316] Получали и подвергали скринингу в общей сложности 235 мутаций. Мутации в следующих остатках изучали в отношении связывания с IL-10 R1: P20, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, K138, S141, E142, D144, I145 или E151. N-концевые и C-концевые усечения также включали в панель на тот случай, если они способствовали изменению активности IL-10. Нумерация мутантных форм основана на SEQ ID NO: 2, которая представляет собой человеческий IL-10 дикого типа без 18-аминокислотного сигнального пептида.

[0317] Полученные и отобранные для дальнейшего анализа мутации включают мутации в петле AB, D41G, L46K; сайте Ia, Q38E (спираль A), Q38R (спираль A), K34D (спираль A), K138L (спираль F), K138D (спираль F); сайте Ib, R27L (спираль A). Каждый из данных мутеинов также включал линкер GGGSGG (SEQ ID NO:2676) между спиралью D и E из IL-10. Иллюстративные последовательности показаны в таблице 1.

[0318] Таблица 1. Последовательности мутеина IL-10

Мутеин	Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
Человеческий IL-10	дикого типа (wt) IL-10 (без сигнального пептида)	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRL RRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA MSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	2
IL-10 M1	IL-10 с линкером GGGSGG (SEQ ID NO: 2676) между петлями D и E	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRL RRCHRFLPCENGGGSGGKSKAVEQVKNAFNKLQ EKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	2211

	E		
R27L	IL-10 M1 c R27L	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLLDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	3
K138L	IL-10 M1 c K138L	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	4
K138D	IL-10 M1 c K138D	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYDAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	5
D41G	IL-10 M1 c D41G	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	6
Q38R	IL-10 M1 c Q38R	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	7
L46K	IL-10 M1 c L46K	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNKLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMI QFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL LRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ EKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	8
K34D	IL-10 M1 c K34D	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVDT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	9
Q38E	IL-10 M1 c Q38E	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFEMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQ FYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNFNLQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	10

[0319] В дополнение к мутационному анализу получали линкеры разных размеров, вставленные между спиралями D и E. Реконструирование по типу rosetta (Huang et al., *PLoS One*. 2011;6(8):e24109) применяли для моделирования структуры белка после вставки разных аминокислот в спиральную структуру IL-10, включая 3-меры, 4-меры, 5-меры и 6-меры. Линкеры GS демонстрировали высокие показатели в моделях. Смоделированные линкерные последовательности изложены в таблице 2.

Таблица 2. Линкеры для мутеинов IL-10

GSG	NPG	GGGG (SEQ ID NO: 2677)	RPTG (SEQ ID NO: 2678)	SGSSG (SEQ ID NO: 2679)	GATGK (SEQ ID NO: 2680)
-----	-----	---------------------------	---------------------------	----------------------------	----------------------------

GSG	GGG	GGGG (SEQ ID NO: 2677)	VPAR (SEQ ID NO: 2681)	SSSSG (SEQ ID NO: 2682)	SSSPG (SEQ ID NO: 2683)
GSG	GGG	SSGG (SEQ ID NO: 2684)	GKTG (SEQ ID NO: 2685)	SSSSG (SEQ ID NO: 2682)	GSGTG (SEQ ID NO: 2686)
SGG	KGT	GGGG (SEQ ID NO: 2677)	GGAG (SEQ ID NO: 2687)	GSSSG (SEQ ID NO: 2688)	RPKAT (SEQ ID NO: 2689)
GSG	GNG	SGSG (SEQ ID NO: 2690)	GGGG (SEQ ID NO: 2677)	SSSSG (SEQ ID NO: 2991)	GSSSG (SEQ ID NO: 2688)
SGS	GNG	SGGG (SEQ ID NO: 2692)	NAGG (SEQ ID NO: 2693)	GSSSG (SEQ ID NO: 2688)	KPGST (SEQ ID NO: 2694)
GGG	RGS	SGGG (SEQ ID NO: 2692)	RPSG (SEQ ID NO: 2695)	SGSGG (SEQ ID NO: 2696)	KGGKG (SEQ ID NO: 2697)
SSG	SGG	GGSS (SEQ ID NO: 2698)	KPTG (SEQ ID NO: 2699)	GGGGS (SEQ ID NO: 2725)	GGGSS (SEQ ID NO: 2700)
GGG	TTS	GSSS (SEQ ID NO: 2701)	GGGG (SEQ ID NO: 2677)	GSSSG (SEQ ID NO: 2688)	GKKAT (SEQ ID NO: 2702)
GGG	KKG	GGSS (SEQ ID NO: 2698)	RSSG (SEQ ID NO: 2703)	SGSGG (SEQ ID NO: 2696)	AKVGS (SEQ ID NO: 2704)

[0320] В таблице 3 показано ингибирование LPS-индуцированного TNF в 293 клетках с помощью выбранных мутеинов IL-10 и слияния мутеина IL-10 с антителом к TREM-1, 1B12. Тяжелая цепь слитых молекул имеет идентифицированные последовательности; последовательность легкой цепи каждой из них представляет собой таковую из антитела 1B12 (SEQ ID NO: 2185).

[0321] Таблица 3. Ингибирование LPS с помощью мутеинов IL-10 и антитела к TREM-1 1B12

Варианты IL-10	Fc-мутеин IL-10 EC50 пМ	Кратность снижения активности по сравнению с IL-10 wt	1B12/мутеин IL-10 EC50 пМ	SEQ ID NO AA слияния IL-10 с HC Ab 1B12
IL-10 wt	0,84		NA	
R27L	1874	2231	285,8	2199
K138L	NA	NA	24,6	2201
K138D	NA	NA	54,4	2203
D41G	NA	NA	8,2	2205
Q38R	NA	NA	2,64	2207
L46K	1229	1463	2,24	2209
K34D	367	436	0,3329	2211
Q38E	112	133	0,063	2213
D144I	NA	NA	NA	2215
D144S	NA	NA	NA	2217
E142Q	NA	NA	NA	2219
IL10M1	NA	NA	NA	2221
TREM1-	NA	NA	NA	2223

1B12(v503KK)- huIL10(Q38E)				
TREM1- 1B12_(v503DD)- huIL10(Q38E)	NA	NA	NA	2225
TREM1- 1B12_(v503KK)- huIL10M1	NA	NA	NA	2227
TREM1- 1B12_(v503DD)- huIL10M1	NA	NA	NA	2229
TREM1-1B12_(C42S, S249G)	NA	NA	NA	2231

[0322] Цель мутеинов IL-10 состоит в сохранении/восстановлении подавляющей активности IL-10 в отношении моноцитов и макрофагов, а также снижении степени обусловленной IL-10 стимуляции CD8⁺ Т-клеток и В-клеток.

Пример 2. Антитела к TREM-1

[0323] Было решено, что для продления периода полужизни и активности IL-10 будет полезно его слияние с фрагментом, нацеливающимся на клеточную поверхность. Получали высокоаффинные моноклональные антитела к TREM-1 и оценивали их в отношении способности к нацеливанию IL-10 на иммунные клетки и продлению периода полужизни IL-10.

[0324] Полностью человеческие антитела к TREM-1 человека получали путем иммунизации трансгенных мышей XENOMOUSE®. См., например, патенты США №№ 6114598; 6162963; 6833268; 7049426 и 7064244.

[0325] Мышей иммунизировали с помощью белка TREM1 человека и/или яванского макака, векторов экспрессии TREM1 и/или клеток CHO, экспрессирующих TREM1. В случае генетических иммунизаций мышей иммунизировали 16 раз в течение 8 недель с применением системы с генной пушкой HELIOS® в соответствии с инструкциями производителя (BioRad, Геркулес, штат Калифорния, США). Вкратце, объединяли векторы экспрессии, кодирующие либо TREM-1 и DAP12 человека, либо TREM-1 и DAP12 яванского макака, и золотые гранулы размером 1,6 мкм (BioRad, Геркулес, штат Калифорния, США) покрывали с помощью 2 мкг общей ДНК и доставляли в эпидермис выбритого участка живота мыши. В случае иммунизаций с помощью растворимого белка мышей иммунизировали с помощью рекомбинантного белка TREM-1 человека или яванского макака, представляющего собой N-концевой внеклеточный домен. Животных иммунизировали с помощью рекомбинантного белка с адъювантом в виде квасцов с CpG-ODN или Sigma Adjuvant System 14-17 раз в течение 10-12 недель с помощью подкожных инъекций, выполняемых в двух местах вдоль средней линии спины мышей, расположенных у основания хвоста и в подлопаточной области. В ходе исходной иммунизации с помощью растворимого белка осуществляли доставку 10 мкг и в ходе последующих бустерных введений - 5 мкг. В случае клеточных иммунизаций мышей иммунизировали с помощью 2-4 миллионов клеток CHO-S, временно экспрессирующих

либо TREM-1 человека, либо TREM-1 яванского макака, с адъювантом в виде квасцов с CpG-ODN. Животных иммунизировали 1 или 2 раза в неделю в общей сложности 13 раз в течение 10 недель, чередуя внутрибрюшинные и подкожные инъекции у основания хвоста. У животных брали кровь и плазму крови собирали в различных временных точках в ходе исследований с использованием иммунизации продолжительностью от 4 недель до 10 недель для оценки титров TREM1-специфичных антител. Титры TREM1-специфичных антител в плазме крови отслеживали с помощью анализа FACS живых клеток на проточном цитометре ACCURIT[™] (BD Biosciences) с применением временно трансфицированных клеток 293T. Животных с наиболее высокими титрами антигенспецифичных антител к TREM1 человека и яванского макака в плазме крови умерщвляли и использовали для получения гибридомы (Kohler and Milstein, 1975)

[0326] *Получение гибридомы.* Идентифицировали животных, демонстрирующих подходящие титры антигенспецифичных антител в сыворотке крови, и объединяли селезенку и/или дренирующие лимфатические узлы от выбранных мышей из каждого сбора. Спленоциты и лимфоциты отделяли от лимфоидной ткани путем измельчения в подходящей среде или с применением полуавтоматического устройства для диссоциации тканей GENTLEMACS[™] Dissociator (Miltenyi Biotec). В-клетки, экспрессирующие IgG, выделяли, размножали с применением стандартных способов и подвергали слиянию с подходящим партнером по слиянию. Образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы тестировали в отношении связывания с TREM-1 человека, временно экспрессируемым на клетках HEK293, с помощью CELLINSIGHT[™]. Вкратце, клетки HEK293 временно котрансфицировали в соотношении 1:1 с конструкциями экспрессии млекопитающих, кодирующими TREM-1 и DAP12 человека, или имитационным вектором и DAP12 по отдельности с применением 293Fectin (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. На следующий день 15000 клеток/лунка трансфицированных клеток HEK293 объединяли с равным объемом тестируемых образцов истощенной среды для гибридомы и ядерного красителя Hoechst 33342 (Pierce) в конечной концентрации 15 мкг/мл при общем объеме 30 мкл/лунка в 384-луночных планшетах FMAT (Corning). После 1-часовой инкубации при комнатной температуре надосадочную жидкость подвергали аспирации с применением устройства для промывания планшетов AQUAMAX®, и лунки промывали в течение 2 циклов с применением 50 мкл/лунка буфера для FACS (PBS (Hyclone), 2% FBS (Sigma)) для каждого цикла на AquaMax. Клетки окрашивали с помощью 5 мкг/мл конъюгированного с Alexa Fluor 488 Fc антитела козы к IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в качестве вторичного антитела, встряхивали на встряхивателе для планшетов Big Bear и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Надосадочную жидкость подвергали аспирации с применением устройства для промывания планшетов AQUAMAX®, лунки снова промывали в течение 2 циклов с применением 50 мкл/лунка буфера для FACS, и 30 мкл буфера для FACS добавляли в каждую лунку с применением устройства Multidrop. Планшеты помещали на встряхиватель для планшетов Big Bear для обеспечения

равномерного распределения клеток в лунках, и затем считывали на платформе CELLINSIGHT™CX7 с применением Cell Health Profiling Bio-App.

[0327] TREM-1-специфичные антитела, идентифицированные в ходе первичного скрининга, оценивали в отношении перекрестной реактивности в отношении TREM-1 яванского макака, а также специфичности в отношении TREM-1, а не в отношении DAP12. Образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM-1 тестировали в отношении связывания с TREM-1 человека или яванского макака, временно экспрессируемым на клетках HEK293, посредством FACS (сборы 1-6) или с помощью CELLINSIGHT™ (сборы 8-9). В случае антител к TREM1 из сборов 1-6 клетки HEK293 временно котрансфицировали в соотношении 1:1 с конструкциями экспрессии млекопитающих, кодирующими TREM-1 и DAP12 человека, TREM-1 и DAP12 яванского макака, или имитационным вектором и DAP12 человека с применением 293Fectin. На следующий день трансфицированные клетки HEK293 переносили в 96-луночные планшеты для FACS при 50000 клеток/лунка и инкубировали с нормализованными образцами надосадочной жидкости культуры гибридомы в конечной концентрации 2,5 мкг/мл в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали и лунки дважды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. 5 мкг/мл конъюгированного с ALEXA FLUOR® 647 Fc антитела козы к IgG человека (Jackson ImmunoResearch) в качестве вторичного антитела для выявления и 2,5 мкг/мл красителя для оценки жизнеспособности клеток 7-аминоактиномицина-D (Sigma) инкубировали с клетками в течение 15 минут при 4°C. Клетки осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали и лунки промывали еще один раз с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. Образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM-1, демонстрирующие связывание, специфичное в отношении TREM-1 человека или TREM-1 яванского макака, выявляли посредством FACS на проточном цитометре BD ACCURI™ C6 с автоматическим пробоотборником Intellicyt. Данные представлены как кратность геометрического среднего (GM) по сравнению с нерелевантным связыванием контрольного антитела. Результаты связывания для определенных антител к TREM-1 показаны в таблице 4.

[0328] Таблица 4. Антитела к TREM1 в ходе скрининга в отношении перекрестной реактивности в отношении человека/яванского макака и специфичности

ID антитела	Кратность GM TREM1 человека	Кратность GM TREM1 яванского макака
3E12	279,6	176,5
34D1	245,8	228,1
30H2	108,1	76,9
44A5	1634,6	2238,4

46H7	1907,9	2688,8
49A2	2218,0	2978,4
50A12	2421,0	2782,1
57C10	1667,8	2429,0
57F5	718,8	2338,9
61B12	1850,3	2093,4
61G5	2072,8	2160,6
63F8	1384,3	2372,3
64D7	1476,6	2151,3
66B8	1634,0	1517,9

[0329] Антитела к TREM1, демонстрирующие высококачественное TREM1-специфичное связывание и перекрестную реактивность в отношении человека/яванского макака, оценивали в отношении их способности блокировать связывание лиганда PGLYRP1 с TREM1/DAP12 человека, временно экспрессируемые на клетках HEK293. Вкратце, клетки HEK293 временно котрансфицировали в соотношении 1:1 с конструкциями экспрессии млекопитающих, кодирующими TREM1 и DAP12 человека, или имитационным вектором и DAP12 человека с применением 293Fectin. На следующий день трансфицированные клетки HEK293 переносили в 96-луночные планшеты для FACS при 50000 клеток/луночка и инкубировали с нормализованными образцами надосадочной жидкости культуры гибридомы в конечной концентрации 2,5 мкг/мл в течение 1 часа при 4°C. PGLYRP1-His человека (R&D Systems) объединяли с PGN-ECndss (пептидогликан, InvivoGen) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли в лунки в конечной концентрации 7,5 мкг/мл PGLYRP1 и 30 мкг/мл PGN. Затем планшеты встряхивали и инкубировали в течение 15 минут при 4°C. Затем клетки осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали и лунки промывали с помощью 200 мкл буфера для FACS. 5 мкг/мл конъюгированного с ALEXA FLUOR® 647 вторичного антитела для выявления к His человека и 2,5 мкг/мл красителя для оценки жизнеспособности клеток 7-аминоактиномицина-D (Sigma) добавляли к клеткам, встряхивали и инкубировали в течение 15 минут при 4°C. Клетки промывали с помощью буфера для FACS, осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали, и промывали еще один раз с помощью буфера для FACS. Затем клетки прогоняли на проточном цитометре BD ACCURI™C6 с автоматическим пробоотборником Intellicyt HYPERCYT®. В общей сложности 518 антител к TREM1 продемонстрировали необходимую специфичную PGLYRP1-блокирующую активность.

Показатели ингибирования рецептор-лиганд для выбранных моноклональных антител к TREM-1 приведены в таблице 5.

[0330] Таблица 5. Ингибирование рецептор-лиганд для выбранных моноклональных антител к TREM1

ID антитела	% ингибирования рецептор-лиганд
3E12	101%
34D1	101%
30H2	101%
44A5	100%
46H7	100%
49A2	100%
50A12	100%
57C10	100%
57F5	100%
61B12	87%
61G5	91%
63F8	93%
64D7	96%
66B8	85%

[0331] Ранжирование относительной аффинности антитела к TREM-1 посредством анализа лимитирования антигена. Образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM1 подвергали ранжированию аффинности в пределах панели по их кинетике связывания с растворимым TREM-1 в ходе анализа лимитирования антигена с применением гранул LUMAVIDIN® (Luminex) в ходе FACS. Вкратце, биотинилированный в собственной лаборатории человеческий антиген TREM-1-His (b-huTREM-1-His) подвергали серийному разбавлению в буфере для FACS и объединяли с равным объемом гранул LUMAVIDIN® (отличающаяся гранула с уникальным штрихкодом для каждой концентрации антигена) с получением серии 2-кратных серийных разбавлений с 5 точками, начинающейся с конечной концентрации антигена b-huTREM-1-His, составляющей 30 нг/мл. Смеси антиген-гранула высевали в 3 лунки в 96-луночный планшет для FACS, затем инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, защищая от света. Затем гранулы осаждали посредством

центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали, и лунки дважды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. Затем отличающиеся гранулы ресуспендировали, объединяли и разбавляли в STABILGUARD® Immunoassay Stabilizer (SurModics) для блокирования неспецифического связывания. Нормализованные образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM-1 объединяли с равным объемом смеси гранул в планшете для FACS в конечной концентрации 5 мкг/мл тестируемого антитела на 0,5 мкл гранул/лунка. Затем планшеты встряхивали и инкубировали в течение ночи на протяжении ~18 часов при комнатной температуре. Затем гранулы осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали, и лунки дважды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. Конъюгированный с ALEXA FLUOR® 488 Fc антитела козы к IgG человека в качестве вторичного антитела для выявления (Jackson ImmunoResearch) добавляли в концентрации 5 мкг/мл в планшеты, встряхивали и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, защищая от света. Гранулы промывали буфером для FACS, осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали и промывали еще один раз буфером для FACS. Затем гранулы ресуспендировали и прогоняли на проточном цитометре BD ACCURI™ C6 с автоматическим пробоотборником Intellicyt HYPERCYT®.

[0332] Образцы культуры гибридомы TREM-1, демонстрирующие сигнал, по меньшей мере в два раза или более превышающий таковой для контрольных образцов антитела IgG, считались демонстрирующими TREM-1-специфичные профили связывания. Сигнал связывания антитела коррелирует с аффинностью антитела; степень связывания антитела с целевым антигеном TREM-1 коррелирует с измеренной интенсивностью флуоресценции и, таким образом, обеспечивает возможность относительного сравнения аффинностей по всей панели. Антитела к TREM-1 с лучшим связыванием в ходе скринингов лимитирования антигена по сравнению с исходным антителом 1B2 были отобраны для секвенирования легкой цепи и анализа расхождения в аффинности в отношении человека/яванского макака. В таблице 6 показаны данные в отношении связывания антитела для выбранных антител к TREM-1 с применением репрезентативной концентрации покрытия антигена, которая находилась в пределах линейного диапазона инструментального выявления сигнала.

[0333] Таблица 6. Показатели относительной аффинности выбранных антител к TREM1 в ходе анализов ограниченного связывания антигена

ID антитела	Растворимый TREM1 7,5 нг/мл (геометрическое среднее по FACS)
3E12	121096
34D1	80444
30H2	91743

44A5	36759
46H7	37975
49A2	28315
50A12	14642
57C10	28498
57F5	25282
61B12	26854
61G5	24835
63F8	25759
64D7	24511
66B8	23784

[0334] *Относительная эпитоп-специфическая сортировка/профилирование TREM1.* Образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM1 оценивали посредством анализа на основе эпитоп-специфической сортировки (модифицированного конкурентного анализа антитело-антитело) с применением гранул LUMAVIDIN® (Luminex) в ходе FACS для определения разнообразия относительно уникальных эпитопных бинов в панели. Вкратце, набор из 15 отличающихся гранул LUMAVIDIN® с уникальным штрихкодом индивидуально объединяли с равным объемом биотинилированного в собственной лаборатории человеческого антигена TREM-1-His, разбавленного в буфере для FACS в конечной концентрации 100 нг/мл. Смеси антиген-гранула высевали в 3 лунки в 96-луночный планшет для FACS, затем инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, защищая от света. Затем гранулы осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали, и лунки дважды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. 15 разных антител к TREM-1 с разнообразными перегруппировками VDJ и хорошими количественными показателями, которые продемонстрировали хорошее связывание в ходе анализа лимитирования антигена, были отобраны в качестве эталонных антител для предварительного покрытия гранул. Данные 15 антител получали в насыщающей концентрации 5 мкг/мл в буфере для FACS и инкубировали с каждой из 15 отличающихся гранул LUMAVIDIN® в течение 1 часа при комнатной температуре, защищая от света. Гранулы осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость удаляли стряхиванием, и лунки трижды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. Затем отличающиеся гранулы ресуспендировали, объединяли и разбавляли в STABILGUARD® Immunoassay Stabilizer (SurModics) для блокирования неспецифического связывания. Нормализованные образцы

надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM-1 (тестируемые антитела) объединяли с равным объемом смеси гранул в планшете для FACS в конечной концентрации 5 мкг/мл тестируемого антитела на 0,5 мкл гранул/лунка. Затем планшеты встряхивали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, защищая от света. Затем гранулы осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали, и лунки дважды промывали с помощью 200 мкл/лунка буфера для FACS. Конъюгированный с ALEXA FLUOR® 488 Fc антитела козы к IgG человека в качестве вторичного антитела для выявления (Jackson ImmunoResearch) добавляли в концентрации 5 мкг/мл в планшеты, встряхивали и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, защищая от света. Гранулы промывали буфером для FACS, осаждали посредством центрифугирования, надосадочную жидкость отбрасывали и промывали еще один раз буфером для FACS. Затем гранулы ресуспендировали и прогоняли на проточном цитометре BD ACCURI™ C6 с автоматическим пробоотборником Intellicyt HYPERCYT®.

[0335] Тестируемые антитела, конкурирующие за сходный эпитоп на антигене TREM-1 с эталонными антителами, лишены возможности связываться, в то время как неконкурирующие антитела способны связываться, генерируя дополнительный сигнал с эталонным антителом. Общее количество связанных антител затем выявляют с помощью вторичного антитела. Для определения профилей конкурентного/связывания антитела для отдельных тестируемых антител сигнал связывания только для эталонного антитела вычитали из сигнала для эталонного антитела с тестируемым антителом для каждой реакции конкурентного/связывания (т. е. по всему набору эталонных антител). Сводные данные по относительной эпитоп-специфической сортировке для выбранных антител к TREM-1 показаны ниже в таблице 7.

[0336] **Таблица 7. Относительные эпитопные бины для выбранных ведущих антител к TREM1**

ID антитела	Эпитопный бин
3E12	B
34D1	H. O.
30H2	H. O.
44A5	A
46H7	A
49A2	A
50A12	A.1
57C10	A
57F5	A
61B12	A
61G5	A
63F8	A
64D7	A
66B8	A

[0337] *Определение расхождения в аффинности в отношении человека/яванского макака для антитела к TREM1. Антитела к TREM-1 с уникальными*

последовательностями CDR3, которые также продемонстрировали лучшее связывание в ходе скринингов лимитирования антигена по сравнению с исходным антителом, анализировали в отношении их аффинности в отношении TREM-1 человека и яванского макака. Аффинность связывания K_D (М), константу скорости ассоциации k_a ($M^{-1}s^{-1}$) и константу скорости диссоциации k_d (s^{-1}) определяли на панели из 114 антител к TREM-1 с применением устройства OCTET® HTX (ForteBio). Вкратце, образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы TREM-1, нормализованные до 10 мкг/мл в нулевой среде DMEM, получали посредством разбавления 1:10 в буфере для анализа OCTET® (10 mM Tris, 0,1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,1 мг/мл BSA при pH 7,6) до конечной тестируемой концентрации 1 мкг/мл. Аминореактивные биосенсоры второго поколения AR2G (Molecular Devices) предварительно инкубировали в 200 мкл воды, очищенной с помощью нанопор, в течение минимум 10 минут при комнатной температуре перед применением. Затем биосенсоры AR2G активировали в течение 5 минут в растворе 20 mM EDC (гидрохлорида 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида) (ForteBio), предварительно смешанного с 10 mM NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) (ForteBio) в воде, очищенной с помощью нанопор. Полученное в собственной лаборатории моноклональное антитело мыши к Fc человека сочетали с биосенсорами AR2G в концентрации 10 мкг/мл в 10 mM натрий-ацетатного буфера при pH 5 в течение 5 минут, гасили с помощью 1M этаноламина при pH 8,5 в течение 5 минут и затем применяли для захвата антитела из раствора. Тестируемые антитела к TREM-1 загружали на биосенсоры в течение 5 минут, и измерения исходного уровня проводили в течение 1 минуты. Затем рекомбинантный растворимый белок TREM-1-His человека связывался с биосенсорами с загруженным антителом в серии 3-кратных разбавлений, покрывающей 6 точек от 450 нМ до 1,85 нМ или от 150 нМ до 0,62 нМ. Ассоциацию рекомбинантного человеческого TREM-1 с сенсором с загруженным антителом измеряли в течение 5 минут с последующей диссоциацией в буфере OCTET® в течение 10 минут. Затем биосенсоры регенерировали с помощью 10 mM глицина при pH 1,7, повторно загружали такие же антитела к TREM-1 на такие же сенсоры в течение 5 минут, и такой же способ применяли для измерения ассоциации и диссоциации для белка TREM-1-His яванского макака. Данные соотносили с применением 0 нМ эталонного аналитического сенсора. Кинетический анализ выполняли с применением модели Ленгмюра 1:1 с массопереносом в программном обеспечении Genedata Screener. Идентифицировали антитела к TREM-1, которые соответствовали проектным целям и демонстрировали менее чем 10-кратную разницу в аффинности между TREM-1 человека и яванского макака, и показатели их аффинности связывания показаны в таблице 8.

[0338] Таблица 8. Антитела к TREM1 с <10-кратным расхождением в аффинности в отношении TREM-1 человека и яванского макака

ID антитела	Аффинность связывания для TREM1 человека			Аффинность связывания для TREM1 яванского макака		
	K_D (М)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (М)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})

3E12	5,70E-10	4,62E+05	2,63E-04	1,80E-09	4,89E+05	8,82E-04
34D1	8,81E-10	2,33E+05	2,05E-04	4,97E-09	2,58E+05	1,28E-03
30H2	8,98E-10	3,26E+05	2,93E-04	5,70E-09	2,14E+05	1,22E-03
44A5	4,04E-10	4,51E+05	1,82E-04	2,02E-09	7,51E+05	1,52E-03
46H7	4,57E-10	7,37E+05	3,36E-04	9,93E-10	1,14E+06	1,13E-03
49A2	7,67E-10	3,73E+05	2,86E-04	1,87E-09	7,73E+05	1,44E-03
50A12	4,85E-09	5,19E+05	2,52E-03	6,42E-09	6,87E+05	4,41E-03
57C10	8,24E-10	3,04E+05	2,51E-04	1,28E-09	1,87E+05	2,40E-04
57F5	<2,81E-10*	6,27E+05	<1,76E-4*	<2,9E-10*	6,07E+05	<1,76E-4*
61B12	<5,57E-10*	3,16E+05	<1,76E-4*	1,27E-09	3,91E+05	4,95E-04
61G5	<2,85E-10*	6,18E+05	<1,76E-4*	1,31E-09	3,64E+05	4,76E-04
63F8	<2,20E-10*	7,99E+05	<1,76E-4*	8,56E-10	7,52E+05	6,44E-04
64D7	<2,50E-10*	7,05E+05	<1,76E-4*	6,80E-10	5,19E+05	3,53E-04
66B8	7,98E-09	1,71E+05	1,36E-03	1,64E-09	1,54E+05	2,53E-04

*символ < обозначает, что менее чем 10% TREM1 было диссоциировано во время отведенного 10-минутного периода диссоциации, что указывает на то, что k_d составляет $<1,76E-4 \text{ c}^{-1}$. $< K_D$ (M) рассчитывают исходя из $k_d <1,76E-4 \text{ c}^{-1}$.

[0339] Антитела отбирали на основании связывания с TREM-1 человека или яванского макака, отсутствия связывания с TREM2 и их способности блокировать связывание PGLYRP1 с TREM-1. 14 антител отбирали для дальнейшего исследования, как изложено в таблице 9.

[0340] Таблица 9. Клоны антитела к TREM-1

ID	Vh	Vлгкой цепи	HCDR3	KD для человека	KD для яванского макака
66B8	VH111-02/D6I6-6IRF1/JH5	VK11L5/JK5	AGYSTSWKDW FDP (SEQ ID NO: 38)	7,98E-09	1,64E-09
44A5	VH3I3-23/D6I6-6IRF1/JH4	VK31L2/JK4	AYYSNYLFDY (SEQ ID NO: 238)	4,04E-10	2,02E-09
46H7		VK31L2/JK1	EFSSNSLFDY (SEQ ID NO: 218)	4,57E-10	9,93E-10
57F5	VH3I3-	VK11O12/JK4	EGGSNRYFHH	<2,81E-10	<2,9E-10

	23/D111- 26IRF3/JH1		(SEQ ID NO: 138)		
30H2		VK3IL2/JK1	VAGSNFFFDH (SEQ ID NO: 258)	8,98E-10	5,70E-09
3E12	VH111- 02/D111- 1IRF1/JH4	VL3IL2r/JL2	DQRKTTVTPFE Y (SEQ ID NO: 298)	5,70E-10	1,80E-09
61B12	VH111- 08/D616- 6IRF1/JH3	VK1IO18/JK4	GGISSSWHWA FDI (SEQ ID NO: 118)	<5,57E-10	1,27E-09
63F8	VH111- 08/D616- 13IRF1/JH4	VK1IO18/JK4	GGRTSIWSFVF DY (SEQ ID NO: 78)	<2,20E-10	8,56E-10
57C10	VH111- 08/D616- 13IRF1/JH2	VK1IO18/JK4	GGYTSAWRW YFDL (SEQ ID NO: 158)	8,24E-10	1,28E-09
34D1	VH111- 08/D313- 22IRF2/JH2	VK1IO18/JK5	GGYTSSWRWY FDL (SEQ ID NO:278)	8,81E-10	4,97E-09
49A2	VH313- 07/D111- 1IRF1/JH1	VK3IL2/JK4	GGWRFES (SEQ ID NO: 198)	7,67E-10	1,87E-09
61G5	VH111- 08/D717- 27IRF1/JH1	VK1IO18/JK5	LIGYSSAWKW SFQH (SEQ ID NO: 98)	<2,85E-10	1,31E-09
64D7	VH111- 08/D616- 19IRF2/JH2	VK1IO18/JK4	RRAVYRSSWE WYFDL (SEQ ID NO: 58)	<2,50E-10	6,80E-10
50A12	VH313- 07/D414- 17IRF2/JH4	VK1IL5/JK1	DYGDSFDY (SEQ ID NO: 178)	4,85E-09	6,42E-09

[0341] Пример 3. Переформатирование антител к TREM-1

[0342] Ведущие антитела к TREM-1 из кампании XenoMouse® преобразовывали в формат антитела подтипа IgG1z посредством слияния домена VL из легких каппа-цепей с доменом СК, домена VL из легких лямбда-цепей с доменом CL и доменов VH с последовательностью CH1-CH2-CH3(221-447). Домен CH2 из данного изотипа антитела конструировали для снижения эффекторной функции посредством включения мутации N297G и для улучшения термостабильности посредством сконструированной дисульфидной связи (R292C, V302C); данный изотип антитела обозначен SEFL2 IgG1z. Ведущие антитела к TREM-1 дополнительно конструировали для удаления "горячих точек", или остатков, которые были предсказаны с помощью вычислительной техники или эмпирически определены как негативно влияющие на экспрессию, очистку, термостабильность, коллоидную стабильность, стабильность при длительном хранении,

фармакокинетику *in vivo* и/или иммуногенность молекулы. Ряд аминокислотных мутаций в данных "горячих точках" разрабатывали на основании консервативности, ковариации, химического сходства, прогнозирования исходя из структурного моделирования и предыдущих сведений, полученных в ходе кампаний по разработке других антител. Была разработана небольшая панель рационально разработанных сконструированных антител, которые включали как одиночные мутации, так и комбинации мутаций.

[0343] Рекомбинантные конструкции экспрессии для рационально разработанной панели вариантов со сконструированными "горячими точками" получали с применением клонирования Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих переменные домены антител, 2) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены (т. е. СК или CL, CH1-CH2-CH3(118-447) (R292C, N297G, V302C)), и 3) остова вектора экспрессии млекопитающих. Тяжелые цепи (HC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и легкие цепи (LC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Векторы экспрессии HC и LC котрансфицировали в соотношении 1:1 в клетки CHO-K1 с применением Lipofectamine LTX (Gibco), и стабильные пулы получали посредством пассирования каждые 2-3 дня в присутствии 10 мкг/мл пурамицина и 500 мкг/мл гигромицина до тех пор, пока жизнеспособность клеток не составляла >90% (Vi-CELL BLU, Beckman Coulter). Стабильные пулы высевали в среду для продуцирования при 2×10^6 жизнеспособных клеток на мл культуры и инкубировали при 36°C в 5% CO₂ в течение 6 дней. Надосадочную жидкость культуры клеток собирали посредством центрифугирования, и антитела очищали посредством аффинной хроматографии на магнитных гранулах с применением AmMag™ Protein A Magnetic Beads (GenScript) или MAG SEPHAROSE™ PrismA (Cytiva). Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio OCTET® (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком А. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и % чистоты целевого белка измеряли посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях (MCE NR) с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). Данные для вариантов, полученных данным способом, представлены в таблице 10.

[0344] Таблица 10. Панель рационально разработанных антител к TREM1 со сконструированными "горячими точками"

ID антитела	Тяжелая цепь SEQ ID NO.	Легкая цепь SEQ ID NO:	% материала с HMW	% чистоты целевого белка
-------------	----------------------------------	------------------------------	-------------------------	-----------------------------------

SEFL2 TREM1_30H2.001_huIgGz	1883	2543	1	100
SEFL2 TREM1_34D1.001_huIgGz	1885	2544	3	99
SEFL2 TREM1_3E12.001_huIgGz	1887	2545	4	95
SEFL2 TREM1_44A5.001_huIgGz	1889	2546	1	100
SEFL2 TREM1_46H7_huIgGz	1891	2547	4	98
SEFL2 TREM1_49A2.001_huIgGz	1893	2548	3	97
SEFL2 TREM1_50A12_huIgGz	1895	2549	2	99
SEFL2 TREM1_57C10.001_huIgGz	1897	2550	1	99
SEFL2 TREM1_57F5.001_huIgGz	1899	2551	1	100
SEFL2 TREM1_61B12.001_huIgGz	1901	2552	2	99
SEFL2 TREM1_61G5.001_huIgGz	1903	2553	1	100
SEFL2 TREM1_63F8.001_huIgGz	1905	2554	1	99
SEFL2 TREM1_64D7.001_huIgGz	1907	2555	0	99
SEFL2 TREM1_66B8_huIgGz	1909	2556	1	99
SEFL2 TREM1_34D1.001_huIgGz	1911	2557	3	99
SEFL2 TREM1_44A5.001_huIgGz	1913	2558	3	98
SEFL2 TREM1_50A12_huIgGz	1915	2559	0	98
SEFL2 TREM1_57C10.001_huIgGz	1917	2560	H. O.	H. O.
SEFL2 TREM1_61G5.001_huIgGz	1919	2561	9	97
SEFL2 TREM1_64D7.001_huIgGz	1921	2562	0	100
SEFL2 TREM1_66B8_huIgGz	1923	2563	H. O.	H. O.
TREM1_57C10(VH:N83D_N87S, VL:S77R_C83S_F105Y_E148K)	1925	2564	H. O.	H. O.
TREM1_57C10(VH:N83D, VL:S77R_C83S_F105Y_E148K)	1927	2565	H. O.	H. O.
TREM1_66B8(VH:S81T_W115Y, VL:F7S)	1929	2566	2	99

TREM1_66B8(VH:S81T_W115H, VL:F7S)	1931	2567	0	93
TREM1_66B8(VH:S81T_W115F, VL:F7S)	1933	2568	1	97
TREM1_66B8(VH:S81T, VL:F7S_Q48P)	1935	2569	H. O.	H. O.
TREM1_66B8(VH:S81T, VL:F7S)	1937	2570	H. O.	H. O.
TREM1_19337(VH:N83D, VL:E15V_Y89F)	1939	2571	1	100
TREM1_19337(VH:N83D, VL:E15V_E46Q)	1941	2572	1	98
TREM1_19337(VH:N83D, VL:E15V)	1943	2573	1	99
TREM1_61G5(VH:N83D_W116Y, VL:Q55L_I101F)	1945	2574	1	97
TREM1_61G5(VH:N83D_W116Y, VL:Q55L)	1947	2575	2	98
TREM1_61G5(VH:N83D_W116F, VL:Q55L_I101F)	1949	2576	2	97
TREM1_61G5(VH:N83D_W116F, VL:Q55L)	1951	2577	H. O.	H. O.
TREM1_61G5(VH:N83D_I86T_W11 6Y, VL:Q55L_I101F)	1953	2578	1	98
TREM1_61G5(VH:N83D_I86T, VL:Q55L_I101F)	1955	2579	1	100
TREM1_61G5(VH:N83D, VL:Q55L_I101F)	1957	2580	2	99
TREM1_61G5(VH:N83D, VL:Q55L)	1959	2581	2	99
TREM1_50A12(VH:F90Y_S135V),	1961	2582	0	98

TREM1_50A12(VH:F90Y_S135A),	1963	2583	0	84
TREM1_50A12(VH:F90Y_D112E),	1965	2584	0	99
TREM1_24B1(VH:T48P_N83D, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1967	2585	0	97
TREM1_24B1(VH:S68A_N83D, VL:N20T)	1969	2586	0	99
TREM1_24B1(VH:S65A_S68A_N83 D, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1971	2587	1	97
TREM1_24B1(VH:S65A_N83D, VL:N20T)	1973	2588	0	100
TREM1_24B1(VH:N83D_W134Y, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1975	2589	0	99
TREM1_24B1(VH:N83D_W134H, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1977	2590	1	98
TREM1_24B1(VH:N83D_W134F, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1979	2591	0	97
TREM1_24B1(VH:N83D, VL:N20T_N53K_A88D_F91L_I101F)	1981	2592	0	97
TREM1_24B1(VH:N67Q_N83D, VL:N20T)	1983	2593	0	93
TREM1_24B1(VH:N61Q_N83D, VL:N20T)	1985	2594	0	98
TREM1_24B1(VH:N61Q_N67Q_N8 3D, VL:N20T_N53K_A88D_I101F)	1987	2595	1	98
TREM1_3E12(VH:W77R_T97R, VL:N40Q_C42S_L46Q_I53V_I90T)	1989	2596	H. O.	H. O.
TREM1_3E12(VH:W77R_T97R, VL:N40Q_C42S_I53V_I90T)	1991	2597	H. O.	H. O.
TREM1_3E12(VH:W77R_T97R,	1993	2598	H. O.	H. O.

VL:C42G_L46Q_I53V_I90T)				
TREM1_3E12(VH:W77R_T97R, VL:C42A_L46Q_I53V_I90T)	1995	2599	H. O.	H. O.
TREM1_3E12(VH:W77R, VL:N40Q_C42S_I53V_I90T)	1997	2600	H. O.	H. O.
TREM1_44A5(VLI10T_V74I_G81S_ S98P_C109F_D146E_L147I)	1999	2601	4	99
TREM1_44A5(VLI10T_V74I_G81S_ C108F_W111Y_D146E_L147I)	2001	2602	3	99
TREM1_44A5(VLI10T_V74I_G81S_ C108F_W111F_D146E_L147I)	2003	2603	2	99
TREM1_44A5(VLI10T_V74I_G81S_ C108F_W111H_D146E_L147I)	2005	2604	3	99
TREM1_44A5(VLI10T_V74I_G81S_ S98P_C108F_W111Y_D146E_L147I)	2007	2605	5	98

[0345] Подгруппу из трех ведущих антител к TREM-1, полученных в ходе кампании XENOMOUSE® (30H2 (19330), 49A2 (19333) и 46H7 (19332)), также конструировали посредством дрожжевого дисплея для улучшения технологичности с сохранением связывания с TREM-1. Для каждого антитела были получены библиотеки, где каждую возможную смежную пару остатков во всех шести CDR параллельно подвергали мутации с получением всех возможных аминокислот посредством применения вырожденных кодонов NNK. Библиотеки отображались на поверхности производного дрожжей BJ5464, где Fd-домен был слит с N-концом альфа-агглютина и LC не была слита с поверхностью дрожжей. Эффективность дисплея измеряли посредством связывания конъюгированного с ALEXA FLUOR® 647 антитела к Fab. Библиотеки подвергали сортировке с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для высокого уровня связывания с конъюгированным с биотином рекомбинантным ECD TREM-1) с применением стрептавидина PE в качестве вторичного реагента для флуоресценции. Вариабельные домены, присутствующие в отсортированных пулах с двойным положительным результатом в отношении связывания/дисплея и пулов с положительным результатом в отношении дисплея, амплифицировали с праймерами, специфичными в отношении доменов каркаса 1 (FW1) и FW4 из HC и LC и подвергали анализу NGS на устройстве Illumina MiSeq в течение прогона 2x 300 п. о. Мутации отбирали после обработки данных с помощью общепринятого частотного анализа, где

соотношение показателей частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении связывания делят на показатели частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении дисплея, что затем нормализуют по соотношению для исходной последовательности. Последовательности, для которых показатели после обогащения превышали или были равными таковым для исходной последовательности, считали полезным или допустимым разнообразием и применяли для дополнительного рационального конструирования антитела после созревания аффинности.

[0346] Ведущие сконструированные с помощью дисплея переменные домены подвергали преобразованию с получением изотипа SEFL2 IgG1z и клонировали с применением Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих переменные домены антител, 2) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены (т. е. СК или CL, CH1-CH2-CH3(118-447) (R292C, N297G, V302C)), и 3) остова вектора экспрессии млекопитающих. Тяжелые цепи (HC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и легкие цепи (LC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Векторы экспрессии HC и LC котрансфицировали в соотношении 1:1 в клетки CHO-K1 с применением Lipofectamine LTX (Gibco), и стабильные пулы получали посредством пассирования каждые 2-3 дня в присутствии 10 мкг/мл пурамицина и 500 мкг/мл гигромицина до тех пор, пока жизнеспособность клеток не составляла >90% (Vi-CELL BLU, Beckman Coulter). Стабильные пулы высевали в среду для продуцирования при 2×10^6 жизнеспособных клеток на мл культуры и инкубировали при 36°C в 5% CO₂ в течение 6 дней. Антитела очищали посредством аффинной хроматографии на магнитных гранулах с применением AMMAGTM Protein A Magnetic Beads (GenScript). Идентичность каждой молекулы подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и % чистоты целевого белка измеряли посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях (MCE NR) с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). Данные для вариантов, полученных посредством конструирования "горячих точек" с помощью дрожжевого дисплея, представлены в таблице 11.

[0347] Таблица 11. Вариантные антитела к TREM1, полученные посредством конструирования "горячих точек" с помощью дрожжевого дисплея

ID антитела	HC SEQ ID NO.	LC SEQ ID NO.	% HMW	% чистоты целевого белка
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A,	2011	2233	21	99

VL:S39A_L141Q_Q144K)				
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:S39I_L141Q_Q144K)	2013	2235	22	85
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:S39H_L141Q_Q144K)	2015	2237	21	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:S39V_L141Q_Q144K)	2017	2239	20	87
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:M111I_L141Q_Q144K)	2019	2241	38	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:M111L_L141Q_Q144K)	2021	2243	29	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:W111F_L141Q_Q144K)	2026	2245	15	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:W137Y_L141Q_Q144K)	2025	2247	17	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:W137H_L141Q_Q144K)	2027	2249	17	99
TREM1_30H2(VH:E17G_T24A, VL:W137N_L141Q_Q144K)	2029	2251	17	99
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:L141Q_Q144K)	2031	2253	3	99
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39A_M111L_L141Q_Q144K)	2033	2255	15	95
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39A_M111L_W137H_L141Q_Q144K)	2035	2257	3	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39A_M111L_W137N_L141Q_Q144K)	2037	2259	3	97
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39A_M110L_W111F_L141Q_Q144K)	2039	2261	3	97
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E,	2041	2263	2	96

VL:S39A_M110L_W111F_W137N_L141Q_Q 144K)				
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39A_M110L_W111F_W137H_L141Q_Q 144K)	2043	2265	3	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M111L_L141Q_Q144K)	2045	2267	12	99
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M111L_W137N_L141Q_Q144K)	2047	2269	3	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M111L_W137H_L141Q_Q144K)	2049	2271	2	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M110L_W111F_L141Q_Q144K)	2051	2273	3	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M110L_W111F_W137N_L141Q_Q 144K)	2053	2275	3	98
TREM1_30H2(VH:V4L_E17G_T24A_A99E, VL:S39H_M110L_W111F_W137H_L141Q_Q 144K)	2055	2277	4	98
TREM1_46H7(VL:R50Q)	2057	2279	4	99
TREM1_46H7(VL:S39A_R50Q)	2059	2281	4	99
TREM1_46H7(VL:S39I_R50Q)	2061	2283	4	98
TREM1_46H7(VL:S39H_R50Q)	2063	2285	3	99
TREM1_46H7(VL:S39V_R50Q)	2065	2287	4	99
TREM1_46H7(VL:R50Q_W111F)	2067	2289	4	99
TREM1_46H7(VL:R50Q_W137Y)	2069	2291	4	99
TREM1_46H7(VL:R50Q_W137H)	2071	2293	5	99
TREM1_46H7(VL:R50Q_W137N)	2073	2295	9	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:R50Q)	2075	2297	4	99

TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q)	2077	2299	3	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q_W111F)	2079	2301	4	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q_W137Y)	2081	2303	0	0
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q_W137H)	2083	2305	4	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q_W111F_W137Y)	2085	2307	4	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39A_R50Q_W111F_W137H)	2087	2309	4	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q)	2089	2311	3	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q_W111F)	2091	2313	3	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q_W137N)	2093	2315	9	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q_W137Y)	2095	2317	3	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q_W111F_W137N)	2097	2319	6	99
TREM1_46H7(VH:M12L, VL:S39H_R50Q_W111F_W137Y)	2099	2321	3	99
TREM1_49A2(VH:M55V_A143T, VL:V78F_L139F)	2101	2323	16	99
TREM1_49A2(VH:M55V_A143T, VL:S48P_V78F_L139F)	2103	2325	16	99
TREM1_49A2(VH:M55V_A143T, VL:V78F_F91L_L139F)	2105	2327	14	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_A143T, VL:V78F_L139F)	2107	2329	21	98

TREM1_49A2(VH:M55V_A143T, VL:V78F_W135F_L139F)	2109	2331	21	99
TREM1_49A2(VH:M55V_D61H_A143T, VL:V78F_L139F)	2111	2333	4	99
TREM1_49A2(VH:M55V_G65A_A143T, VL:V78F_L139F)	2113	2335	10	99
TREM1_49A2(VH:M55V_G65L_A143T, VL:V78F_L139F)	2115	2337	6	99
TREM1_49A2(VH:M55V_D72E_A143T, VL:V78F_L139F)	2117	2339	15	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_S73A _A143T, VL:V78F_F91L_W135F_L139F)	2119	2341	16	99
TREM1_49A2(VH:M55V_S73A_A143T, VL:V78F_L139F)	2121	2343	22	98
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_S73A _A143T, VL:S48P_V78F_F91L_L139F)	2123	2345	16	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_S73A _A143T, VL:V78F_F91L_L139F)	2125	2347	22	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_D72 E_A143T, VL:S48P_V78F_F91L_L139F)	2127	2349	15	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_D72 E_A143T, VL:V78F_F91L_L139F)	2129	2351	16	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_D72 E_A143T, VL:S48P_V78F_F91L_W135F_L139F)	2131	2353	21	99
TREM1_49A2(VH:M55V_M58I_G65A_D72 E_A143T, VL:V78F_F91L_W135F_L139F)	2133	2355	21	98
TREM1_49A2(VL:L139F)	2135	2357	12	98

[0348] Сравнение бивалентных и моновалентных mAb к TREM-1 в клетках HEK293, экспрессирующих TREM-1/DAP12, выполняли посредством анализа уровней фосфорилирования киназы Syk в клетках с применением p-Syk ALPHALISA® (Perkin-

Elmer). Вкратце, клетки HEK293, стабильно экспрессирующие TREM1 и DAP12 человека, культивировали в среде Хэма DMEM/F12 (Corning) с добавлением 10% диализированной FBS (Gibco), 2 mM GlutaMAX (Gibco), 2 mM L-глутамин (Sigma), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco) и 0,1 мг/мл зеоцина (Gibco) при 37°C/5%CO₂. За один день до эксперимента клетки отделяли с помощью трипсин-EDTA и центрифугировали при 400 x g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в полной среде перед вторым центрифугированием при 400 x g в течение 5 минут. После центрифугирования клетки ресуспендировали в полной среде в концентрации 1×10⁶ клеток/мл и высевали в 96-луночные полистироловые планшеты с плоским прозрачным дном CELLBIND® (Corning) при конечном объеме 100 мкл/лунка или 50000 клеток/лунка. Планшеты с высеванными клетками инкубировали при 37°C/5%CO₂ в течение ночи на протяжении 18-24 часов. В день эксперимента 70 мкл среды удаляли из каждой лунки. Антитела к TREM1 разбавляли до концентрации, в 3 раза превышающей самую высокую конечную концентрацию в 4-кратном серийном разбавлении, в среде для анализа (среда Хэма DMEM/F12 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS). Реагент для перекрестного связывания Protein G (Sigma) получали в концентрации, в 3 раза превышающей конечную концентрацию, с применением среды для анализа. Титрованные антитела к TREM1 смешивали в соотношении 1:1 либо с белком G, либо со средой для анализа, и 60 мкл каждого антитела к TREM1 +/- реагент для перекрестного связывания добавляли в каждую лунку, содержащую клетки. Данные планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед удалением всей среды из лунок, и затем клетки подвергали лизису с применением 25 мкл/лунка буфера для лизиса (реагент для экстракции белка млекопитающих M-Pex и 1X ингибитора протеазы/фосфатаз Halt). Клетки инкубировали с буфером для лизиса на льду в течение 1 часа перед переносом 5 мкл клеточного лизата в каждую лунку 384-луночного белого планшета (PerkinElmer), содержащего акцепторный коктейль для AlphaLISA® (1 нМ IgG кролика к pSyk (антитело к фосфо-Syk(Tyr525/526) (клон C87C1)) (Cell Signaling Technology), 1 нМ конъюгированного с биотином IgG мыши к Syk (клон 4D10) (BD Biosciences), 10 мкг/мл связывающих IgG кролика акцепторных гранул AlphaLISA® (PerkinElmer) и 1X Halt Inhibitor в 1X AlphaLISA® буфера для иммунологического анализа (PerkinElmer)). Планшеты дополнительно инкубировали на льду в течение 2 часов перед добавлением 5 мкл донорного коктейля для AlphaLISA® (стрептавидин-альфа-донорные гранулы (PerkinElmer) в 1X буфера для иммунологического анализа) в конечной концентрации 40 мкг/мл и инкубированием при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа. После инкубации сигнал фосфо-Syk (pSyk) выявляли посредством FRET (резонансного переноса энергии флуоресценции) с применением планшет-ридера ENVISION® (PerkinElmer). Результаты рассчитывали посредством соотношения сигнала pSyk образца/сигнала pSyk исходного уровня, при этом активность и максимальный сигнал сравнивали между вариациями каждого антитела. Обработка бивалентными mAb к TREM-1 по отдельности индуцирует слабые сигналы в клетках, экспрессирующих TREM-1/DAP12. Отсутствие

сигнала pSyk наблюдали для моновалентных mAb к TREM-1, и перекрестное связывание бивалентных и моновалентных mAb к TREM-1 с Protein G приводит к индуцированию pSyk.

[0349] *Разделение на клады и выравнивание последовательностей антител.* Домены VH и VL вводимых последовательностей антитела экстрагировали и выравнивали по основанной на структуре системе нумерации IgG по Honegger и Pluckthun (J Mol Biol. 309(3):657-70, 2001). Матрицу расстояния генерировали из составного выравнивания множества последовательностей с применением нескорректированной модели, где расстояние между двумя последовательностями представляет собой долю несовпадений как для доменов VH, так и для доменов VL. Наконец, матрицу расстояния применяли для конструирования древа способом UPGMA (способ попарного внутригруппового невзвешенного среднего) (Sokal and Michener, University of Kansas Science Bulletin. 38: 1409-1438, 1958), и родственные последовательности группировали исходя из предела пересечения ветвей, составляющего 0,2. Выравнивания уточняли вручную исходя из химического сходства аминокислот с получением консенсусных последовательностей CDR для каждой группы, разделенной на клады, что в результате привело к получению последовательностей, показанных в таблице 12.

[0350] **Таблица 12. Консенсусные последовательности антигенсвязывающих белков, связывающих TREM-1**

Группа выравнивания	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Группа I	X ₁ ASQSX ₂ X ₃ X ₄ NLA (SEQ ID NO: 2199)	GAX ₁ X ₂ R AT (SEQ ID NO: 2200),	QX ₁ X ₂ X ₃ X X ₄ X ₅ X ₆ PX ₇ T (SEQ ID NO: 2201)	X ₁ X ₂ X ₃ M X ₄ (SEQ ID NO: 2202)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ YYX ₁₀ X X ₁₁ X ₁₂ VKG (SEQ ID NO: 2205)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ YYX ₁₀ (SEQ ID NO: 2203)
	RASQSVN SNLA (SEQ ID NO: 2212) QASQDIH LN (SEQ ID NO: 2215)	GASTRA T (SEQ ID NO: 2219);	QQFKNW PPT (SEQ ID NO: 2222);	AYAMS (SEQ ID NO: 2227)	TSGSGST TYYADS VKG (SEQ ID NO: 2230)	VAGSNFL FDY (SEQ ID NO: 2670).
Группа II	RASQGIR	AASRLQS	LQAHGFP	SYWMS	NIKQDGS	DYGDSF

	KWLA (SEQ ID NO: 2216)	(SEQ ID NO: 2221)	WT (SEQ ID NO: 2224); QFWPPW T (SEQ ID NO: 2226)	(SEQ ID NO: 2229)	EEYYVDS VKG (SEQ ID NO: 2232); TSGSGTY YADSVK G (SEQ ID NO: 2669)	DY (SEQ ID NO: 2673)
Группа III	QASX ₁ DI X ₂ X ₃ X ₄ LN (SEQ ID NO: 2204)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ LET (SEQ ID NO: 2206)	QX ₁ YX ₃ X ₄ X ₅ PX ₆ T (SEQ ID NO: 2207)	X ₁ YDIN (SEQ ID NO: 2208)	X ₁ X ₂ NPX ₃ X ₄ GX ₅ X ₆ G X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ FX ₁₁ X ₁₂ (SEQ ID NO: 2209)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ FX ₁₃ X ₁₄ (SEQ ID NO: 2210)
	QASQDIR KHLN (SEQ ID NO: 2213);	DASNLET (SEQ ID NO: 2220);	QHYDNL PIT (SEQ ID NO: 2223); QQYDNL PLT (SEQ ID NO: 2225)	RYDIN (SEQ ID NO: 2228)	WMNPNS GNSSVQ KFRG (SEQ ID NO: 2231)	GGYTSS WRWYFD L (SEQ ID NO: 2671); GGYTSS WSRWYF DL (SEQ ID NO: 2672)

Пример 4. Получение антигенсвязывающих белков на основе мутеина IL-10

[0351] Оценивают получение и отбор терапевтических слияний бивалентного и моновалентного mAb к TREM-1/мутеина IL-10, PK/PD слияний и эффекты в отношении модели колита с мышинным бивалентным и моновалентным mAb к TREM-1/мутеином IL-10.

[0352] IL-10 дикого типа, IL-10M1 или мутеины IL-10 подвергали слиянию с C-концом Fc-домена антитела к TREM-1. Для почти всех слияний конечный остаток К удален из Fc-области антитела (называемый "desK"). В одном примере линкер между антителом к TREM-1 и вариантом IL-10 представляет собой GGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 2725) и внутренний линкер IL-10 представляет собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676) (G3SG2).

[0353] Получение симметричных слияний мутеинов IL-10 с фрагментами Ab к TREM-1. Слияния антитело-цитокин конструировали посредством слияния IL-10M1 или

сконструированных вариантов IL-10M1 с С-концом тяжелой цепи антитела к TREM-1 SEFL2 IgG1z после удаления конечного остатка Lys (K447-) и присоединения 5-аминокислотного линкера с последовательностью G4S (SEQ ID NO: 2725) между антителом и цитокином. Рекомбинантные конструкции экспрессии антитело-цитокин получали с применением клонирования Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих переменные домены антитела, 2) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих линкер с разработанным цитокином, 3) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены (т. е. СК или CL и CH1-CH2-CH3(118-446)(R292C, N297G, V302C)), и 4) остова вектора экспрессии млекопитающих. Слитые тяжелые цепи (HC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и легкие цепи (LC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Слитые векторы экспрессии HC и LC котрансфицировали в соотношении 1:1 в клетки CHO-K1 с применением LIPOFECTAMINE® LTX (Gibco), и стабильные пулы получали посредством пассирования каждые 2-3 дня в присутствии 10 мкг/мл пурамицина и 500 мкг/мл гигромицина до тех пор, пока жизнеспособность клеток не составляла >90% (Vi-CELL BLU, Beckman Coulter). Стабильные пулы высевали в среду для продуцирования при 2e6 жизнеспособных клеток на мл культуры и инкубировали при 36°C в 5% CO₂ в течение 6 дней. Надосадочную жидкость культуры клеток собирали посредством центрифугирования, и антитела очищали с применением способа автоматической тандемной хроматографии на 3 колонках.

[0354] *Получение асимметричных слияний мутеинов IL-10 с фрагментами Ab к TREM-1.* Асимметричные слияния Fab-гетероFc-цитокин (также называемые "моновалентными" слияниями антитело-цитокин) получали посредством слияния IL-10M1 или сконструированных вариантов IL-10M1 как с С-концом тяжелой цепи антитела, так и с С-концом домена huFc(221-446), оба из которых дополнительно конструировали для предпочтительной гетеродимеризации путем электростатического наведения, управляемого противоположно заряженными мутациями, установленными в домене CH3 каждой цепи ("мутациями с заменой пар заряженных аминокислот"). Таким образом, слияния Fab-гетероFc-цитокин представляют собой трехцепочечные белки, содержащие 1) LC антитела, 2) HC антитела изотипа SEFL2 IgG1z, которую дополнительно конструировали с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот E356K и D399K и с которой слит IL-10M1 или вариант IL-10M1 в области С-конца после удаления конечного остатка Lys (K447-) и присоединения 5-аминокислотного линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2725) между антителом и цитокином, и 3) домен huFc(221-446) изотипа SEFL2 IgG1z, дополнительно сконструированный с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот K392D, K409D и K434D (нижнее подчеркивание в последовательности ниже) и с которым слит IL-10M1 или вариант IL-10M1 в области С-конца после удаления конечного остатка Lys (K447-) и присоединения 5-аминокислотного

линкера с последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2725) (без нижнего подчеркивания, жирный шрифт) между Fc и цитокином (иллюстративный мутеин IL-10, двойное нижнее подчеркивание):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPP
VLDSGDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQDSLSLSPGGGGGSSPG
QGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLLDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLG
CQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKLRLRLRRCHRFLPCENGGS
GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFYIEAYMTMKIRN.

[0355] Надосадочную жидкость культуры клеток собирали посредством центрифугирования, и слитые антитела очищали с применением способа автоматической тандемной хроматографии на 3 колонках. Слитые антитела захватывали посредством аффинной хроматографии, и непосредственно подвергали замене буфера посредством гель-фильтрации с применением смолы SEPHADEX® G25 (Cytiva), и дополнительно обрабатывали посредством эксклюзионной хроматографии с применением смолы SUPERDEX® 200 Increase (Cytiva). Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio OCTET® (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком А. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после эксклюзионной хроматографии (SEC), измеряли посредством аналитической SEC, и % чистоты целевого белка измеряли посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях с применением LABCHIP® GXII (Perkin Elmer). Склонность к агрегации и стабильность мономера оценивали посредством стрессового воздействия на образцы при 40° C в течение 1 и 2 недель. Затем образцы, подвергнутые стрессовому воздействию, и образцы T₀ анализировали посредством аналитической SEC для количественного определения повышения уровня агрегации (% HMW) и потери мономеров в T₀ по сравнению с образцами после стрессового воздействия. Результаты для выбранных молекул показаны в таблицах 13А и 13В. Биспецифическую функциональную активность измеряли посредством ингибирования выработки TNFα в стимулированных с помощью LPS PBMC.

[0356] Таблица 13А. Характеристики слитых белков TREM-1-IL-10

Клон	% HMW	% чистоты целевого белка	SEQ ID NO тяжелой цепи	SEQ ID NO легкой цепи
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[R27L]	73	45	863	864
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[K138L]	90	88	865	866
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[K138D]	64	48	867	868
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[D41G]	96	82	869	870
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[Q38R]	96	88	871	872
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[L46K]	97	91	873	874

TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[K34D]	69	92	875	876
TREM1_30H2.001_G4S_huIL10[Q38E]	94	90	877	878
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[R27L]	70	59	879	880
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[K138L]	0	90	881	882
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[K138D]	69	63	883	884
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[D41G]	97	88	885	886
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[Q38R]	98	94	887	888
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[L46K]	98	92	889	890
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[K34D]	65	91	891	892
TREM1_44A5.001_G4S_huIL10[Q38E]	94	93	893	894
TREM1_46H7_G4S_huIL10[R27L]	71	49	895	896
TREM1_46H7_G4S_huIL10[K138L]	86	89	897	898
TREM1_46H7_G4S_huIL10[K138D]	74	50	899	900
TREM1_46H7_G4S_huIL10[D41G]	96	86	901	902
TREM1_46H7_G4S_huIL10[Q38R]	97	94	903	904
TREM1_46H7_G4S_huIL10[L46K]	97	91	905	906
TREM1_46H7_G4S_huIL10[K34D]	64	91	907	908
TREM1_46H7_G4S_huIL10[Q38E]	93	92	909	910
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[R27L]	82	50	911	912
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[K138L]	91	90	913	914
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[K138D]	73	42	915	916
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[D41G]			917	918
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[Q38R]	99	96	919	920
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[L46K]	98	96	921	922
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[K34D]	78	87	923	924
TREM1_49A2.001_G4S_huIL10[Q38E]	97	93	925	926
TREM1_50A12_G4S_huIL10[R27L]	92	72	927	928
TREM1_50A12_G4S_huIL10[K138L]	90	86	929	930
TREM1_50A12_G4S_huIL10[K138D]			931	932
TREM1_50A12_G4S_huIL10[D41G]	96	73	933	934
TREM1_50A12_G4S_huIL10[Q38R]	97	73	935	936
TREM1_50A12_G4S_huIL10[L46K]	98	64	937	938
TREM1_50A12_G4S_huIL10[K34D]	82	89	939	940
TREM1_50A12_G4S_huIL10[Q38E]			941	942
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[R27L]	75	51	943	944
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[K138L]	88	93	945	946
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[K138D]	65	52	947	948
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[D41G]	96	86	949	950
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[Q38R]	97	95	951	952
TREM1_57C10.001_G4S_huIL10[L46K]	98	94	953	954
TREM1_57C10_G4S_huIL1[K34D]			955	956
TREM1_57C10_G4S_huIL10[Q38E]			957	958
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[R27L]	78	62	959	960
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[K138L]	88	93	961	962
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[K138D]	63	57	963	964
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[D41G]	95	87	965	966
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[Q38R]	96	97	967	968
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[L46K]	96	94	969	970

TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[K34D]	72	96	971	972
TREM1_61G5.001_G4S_huIL10[Q38E]	92	93	973	974
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[R27L]	75	51	975	976
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[K138L]	89	90	977	978
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[K138D]	64	57	979	980
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[D41G]	96	85	981	982
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[Q38R]	97	95	983	984
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[L46K]	98	93	985	986
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[K34D]	70	85	987	988
TREM1_63F8_G4S_huIL10[Q38E]			989	990
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[R27L]	62	51	991	992
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[K138L]	93	94	993	994
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[K138D]	77	55	995	996
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[D41G]	98	91	997	998
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[Q38R]	99	98	999	1000
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[L46K]	98	96	1001	1002
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[K34D]	81	91	1003	1004
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[Q38E]	96	95	1005	1006
TREM1_66B8_G4S_huIL10[R27L]	80	59	1007	1008
TREM1_66B8_G4S_huIL10[K138L]	91	91	1009	1010
TREM1_66B8_G4S_huIL10[K138D]	70	63	1011	1012
TREM1_66B8_G4S_huIL10[D41G]	98	89	1013	1014
TREM1_66B8_G4S_huIL10[Q38R]	98	96	1015	1016
TREM1_66B8_G4S_huIL10[L46K]	99	95	1017	1018
TREM1_66B8_G4S_huIL10[K34D]	72	94	1019	1020
TREM1_66B8_G4S_huIL10[Q38E]	96	92	1021	1022
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[R27L]	66	68	1023	1024
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[K138L]	85	99	1025	1026
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[K138D]	57	68	1027	1028
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[D41G]	94	89	1029	1030
TREM1_3E12_G4S_huIL10[Q38R]			1031	1032
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[L46K]	97	98	1033	1034
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[K34D]	59	94	1035	1036
TREM1_3E12.001_G4S_huIL10[Q38E]	92	99	1037	1038
TREM1_61B12_G4S_huIL10[R27L]			1039	1040
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138L]	85	91	1041	1042
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D]	58	53	1043	1044
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[D41G]	93	88	1045	1046
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38R]	95	94	1047	1048
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K]	97	92	1049	1050
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K34D]	65	91	1051	1052
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E]	93	92	1053	1054
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[R27L]	75	48	1055	1056
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[K138L]	89	86	1057	1058
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[K138D]	67	50	1059	1060
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[D41G]	94	76	1061	1062
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[Q38R]	95	83	1063	1064
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[L46K]	95	80	1065	1066
TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[K34D]	65	85	1067	1068

TREM1_57F5.001_G4S_huIL10[Q38E]	93	82	1069	1070
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[R27L]	86	60	1071	1072
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[K138L]	92	96	1073	1074
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[K138D]	78	49	1075	1076
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[D41G]	98	95	1077	1078
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[Q38R]	98	98	1079	1080
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[L46K]	98	98	1081	1082
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[K34D]	82	92	1083	1084
TREM1_34D1.001_G4S_huIL10[Q38E]	96	96	1085	1086

[0357] Таблица 13В. Характеристики выбранных слитых белков с показанными последовательностями Fc

Клон	% HM W	% чистоты целевог о белка	SEQ ID NO тяжело й цепи	SEQ ID NO легко й цепи	Fc- област ь
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	70	29	1087	1088	1089
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[K138L]	97	80	1090	1091	1092
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	79	37	1093	1094	1095
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	96	81	1096	1097	1098
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	67	63	1105	1106	1107
TREM1_30H2.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	94	88	1108	1109	1110
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	88	29	1111	1112	1113
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[K138L]	92	82	1114	1115	1116
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	85	36	1117	1118	1119
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[Q38R]	96	89	1123	1124	1125
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	97	87	1126	1127	1128
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	71	69	1129	1130	1131
TREM1_44A5.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	95	88	1132	1133	1134
TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[K138L]	89	82	1138	1139	1140
TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[K138D]	78	33	1141	1142	1143
TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[Q38R]	97	92	1147	1148	1149
TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[L46K]	98	86	1150	1151	1152
TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[K34D]	66	65	1153	1154	1155

TREM1_46H7_mono_G4S_huIL10[Q38E]	94	88	1156	1157	1158
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	87	34	1159	1160	1161
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[K138L]	90	82	1162	1163	1164
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	80	36	1165	1166	1167
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	94	81	1168	1169	1170
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[Q38R]	97	90	1171	1172	1173
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	96	86	1174	1175	1176
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	63	66	1177	1178	1179
TREM1_49A2.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	95	87	1180	1181	1182
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[R27L]	92	30	1183	1184	1185
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[K138L]	91	82	1186	1187	1188
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[K138D]	86	24	1189	1190	1191
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[D41G]	95	80	1192	1193	1194
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[Q38R]	96	92	1195	1196	1197
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[L46K]	96	89	1198	1199	1200
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[K34D]	69	82	1201	1202	1203
TREM1_50A12_mono_G4S_huIL10[Q38E]	95	88	1204	1205	1206
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	81	19	1207	1208	1209
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[K138L]	88	82	1210	1211	1212
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	77	31	1213	1214	1215
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	95	80	1216	1217	1218
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[Q38R]	96	91	1219	1220	1221
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	97	87	1222	1223	1224
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	67	57	1225	1226	1227
TREM1_57C10.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	93	89	1228	1229	1230
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[R	93	87	1231	1232	1233

27L]					
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	75	54	1237	1238	1239
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	93	88	1240	1241	1242
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[Q38R]	92	87	1243	1244	1245
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	0	0	1246	1247	1248
TREM1_61G5.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	86	65	1252	1253	1254
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	79	34	1255	1256	1257
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[K138L]	88	82	1258	1259	1260
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	76	34	1261	1262	1263
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	95	79	1264	1265	1266
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[Q38R]	96	89	1267	1268	1269
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	97	86	1270	1271	1272
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	0	0	1273	1274	1275
TREM1_63F8.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	93	83	1276	1277	1278
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[R27L]	83	29	1279	1280	1281
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[K138D]	72	36	1285	1286	1287
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[D41G]	97	82	1288	1289	1290
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[L46K]	97	89	1294	1295	1296
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[K34D]	0	0	1297	1298	1299
TREM1_64D7.001_моно_G4S_huIL10[Q38E]	0	0	1300	1301	1302
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[R27L]	85	32	1303	1304	1305
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[K138D]	0	0	1309	1310	1311
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[D41G]	96	83	1312	1313	1314
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[Q38R]	97	92	1315	1316	1317
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[L46K]	97	91	1318	1319	1320
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[K34D]	73	70	1321	1322	1323
TREM1_66B8_моно_G4S_huIL10[Q38E]	0	0	1324	1325	1326
TREM1_3E12.001_моно_G4S_huIL10[K	77	32	1333	1334	1335

138D]					
TREM1_3E12.001_МОНО_G4S_huIL10[D41G]	96	73	1336	1337	1338
TREM1_3E12.001_МОНО_G4S_huIL10[L46K]	97	82	1342	1343	1344
TREM1_3E12.001_МОНО_G4S_huIL10[K34D]	66	56	1345	1346	1347
TREM1_3E12.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38E]	94	79	1348	1349	1350
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[R27L]	78	33	1351	1352	1353
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[K138L]	89	82	1354	1355	1356
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[K138D]	81	34	1357	1358	1359
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[D41G]	95	82	1360	1361	1362
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38R]	96	90	1363	1364	1365
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[L46K]	97	88	1366	1367	1368
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[K34D]	74	62	1369	1370	1371
TREM1_61B12.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38E]	94	88	1372	1373	1374
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[R27L]	79	36	1375	1376	1377
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[K138L]	87	82	1378	1379	1380
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[K138D]	80	33	1381	1382	1383
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[D41G]	93	77	1384	1385	1386
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38R]	95	88	1387	1388	1389
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[L46K]	96	82	1390	1391	1392
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[K34D]	74	67	1393	1394	1395
TREM1_57F5.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38E]	93	86	1396	1397	1398
TREM1_34D1.001_МОНО_G4S_huIL10[R27L]	87	35	1399	1400	1401
TREM1_34D1.001_МОНО_G4S_huIL10[K138L]	92	82	1402	1403	1404
TREM1_34D1.001_МОНО_G4S_huIL10[D41G]	97	82	1408	1409	1410
TREM1_34D1.001_МОНО_G4S_huIL10[Q38R]	95	93	1411	1412	1413
TREM1_34D1.001_МОНО_G4S_huIL10[L46K]	97	88	1414	1415	1416

TREM1_34D1.001_моно_G4S_huIL10[K 34D]	80	54	1417	1418	1419
TREM1_34D1.001_моно_G4S_huIL10[Q 38E]	95	90	1420	1421	1422

[0358] Первый, второй и третий переход в расплавленное состояние (Tm1, Tm2, Tm3, соответственно) измеряли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с применением MicroCal (Malvern) с использованием репрезентативной подгруппы молекул, показанных в таблице 14.

[0359] Таблица 14. Переходы в расплавленное состояние слитых белков мутеин IL-10-антитело к TREM-1

МАВ К TREM-1	МУТАЦИЯ IL-10	TM1	TM2	TM3
61B12	L46K	77,8	80,8	87,6
61B12	Q38R	78,2	80,6	87,1
61B12	Q38E	77,9	80,7	87,9

[0360] Молекулы антитело-цитокин для доказательства концепции (PoC) получали в виде молекул, характеризующихся либо бивалентными, либо моновалентными слияниями с цитокином. С-концевой IL-10M1 или мутеин Q38E подвергали слиянию с репрезентативным антителом к TREM1, 1B12. В случае всех версий данных молекул PoC концевой Lys на С-конце антитела был удален, и последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2725) была добавлена для соединения цитокина с антителом (как отмечалось ранее). Кроме того, в случае версий молекул PoC с моновалентным цитокином Fc-часть антитела была сконструирована с теми же мутациями с заменой пар заряженных аминокислот, которые упоминались ранее. Моновалентные цитокины подвергали слиянию либо с положительным (E356K и D399K), либо с отрицательным (K392D, K409D и K434D) плечом тяжелой цепи антитела.

[0361] Рекомбинантные конструкции экспрессии Fab-антитело-цитокин и PoC антитело-цитокин получали с применением клонирования Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих вариабельные домены антитела, 2) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих линкер с разработанным цитокином, 3) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены (т. е. СК или CL, CH1-CH2-CH3(118-446)(R292C, N297G, V302C, E356K, D399K), CH2-CH3(221-446)(R292C, N297G, V302C, K392D, K409D, K434D)), и 4) остова вектора экспрессии млекопитающих. Слитые HC и слитые Fc-домены собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и LC собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Векторы экспрессии слитой HC, слитого Fc и LC котрансфицировали в соотношении 1:1:1 в клетки CHO-K1 с применением LIPOFECTAMINE® LTX (Gibco), и стабильные пулы получали посредством пассирования каждые 2-3 дня в присутствии 10 мкг/мл пурамицина и 500 мкг/мл гигромицина до тех пор, пока жизнеспособность клеток не составляла >90% (Vi-CELL BLU®, Beckman Coulter). Стабильные пулы высевали в среду для продуцирования при 2e6

жизнеспособных клеток на мл культуры и инкубировали при 36°C в 5% CO₂ в течение 6 дней.

[0362] Надосадочную жидкость культуры клеток собирали посредством центрифугирования, и слитые антитела очищали с применением способа автоматической тандемной хроматографии на 3 колонках. Слияния Fab-гетероFc-цитокин захватывали посредством аффинной хроматографии с применением CAPTURESELECT™ CH1 XL (ThermoFisher), непосредственно подвергали замене буфера посредством гель-фильтрации с применением смолы SEPHADEX® G25 (Cytiva), и дополнительно обрабатывали посредством эксклюзионной хроматографии с применением смолы SUPERDEX® 200 Increase (Cytiva). Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio OCTET® (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком А. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC), и % чистоты целевого белка измеряли посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях с применением LABCHIP® GXII (Perkin Elmer). Склонность к агрегации и стабильность мономера оценивали посредством стрессового воздействия на образцы при 40° С в течение 1 и 2 недель. Затем образцы, подвергнутые стрессовому воздействию, и образцы T0 анализировали посредством аналитической SEC для количественного определения повышения уровня агрегации (% HMW) и потери мономеров после стрессового воздействия по сравнению с T0. Биспецифическую функциональную активность измеряли посредством ингибирования выработки TNFα в стимулированных с помощью LPS PBMC, и результаты для выбранных молекул показаны в таблице 15.

[0363] Таблица 15. Данные функционального анализа для выбранных биспецифических слияний с цитокином

ID	Тип белка	EC50 (нМ) в ходе анализа LPS-stim PBMC n=1	EC50 (нМ) в ходе анализа LPS-stim PBMC n=2	EC50 (нМ) в ходе анализа LPS-stim PBMC n=3
21324	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	N/A	N/A	N/A
21330	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	2	2	2
21338	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	3	N/A	3
21369	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	4	3	4
21351	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	3	N/A	N/A
21358	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	5	N/A	N/A
21365	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	N/A	3	2

21374	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	N/A	N/A	2
21381	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	3	3	3
22437	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	N/A	2	4
21387	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	3	N/A	2
21392	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	5	5	N/A
21404	Слияние Fab-гетероFc-цитокин	3	3	2
21225	Слияние антитело-цитокин	4	3	3
21233	Слияние антитело-цитокин	3	3	N/A
21241	Слияние антитело-цитокин	2	2	3
21248	Слияние антитело-цитокин	N/A	2	N/A
21255	Слияние антитело-цитокин	N/A	2	N/A
21262	Слияние антитело-цитокин	N/A	3	N/A
21268	Слияние антитело-цитокин	N/A	N/A	2
21276	Слияние антитело-цитокин	3	N/A	3
21283	Слияние антитело-цитокин	4	3	N/A
21291	Слияние антитело-цитокин	3	3	3
22424	Слияние антитело-цитокин	N/A	N/A	N/A
21298	Слияние антитело-цитокин	3	2	2
21306	Слияние антитело-цитокин	5	N/A	5
21410	Слияние антитело-цитокин	3	2	2

N/A - отсутствие надлежащей дозовой кривой, 1= >0,001 - <0,01; 2= >0,01 - <0,1; 3= >0,1 - <1; 4= >1 - <10, 5= >10

[0364] Моновалентные и бивалентные антитела, полученные как описано выше и слитые с мутеином IL-10 Q38E, тестировали в отношении активации моноцитов. Вкратце, моноциты выделяли из замороженных PBMC с применением набора для выделения Miltenyi Monocyte Isolation Kit II. Очищенные моноциты высевали в полные среды при 10^5 клеток на лунку в 96-луночный планшет с круглыми лунками, обработанный с помощью ТС. Указанные тестируемые белки подвергали серийному разбавлению 1:5 от 11000 пМ до 0,005 пМ. LPS добавляли к клеткам в конечной концентрации 10 нг/мл. Планшеты

инкубировали в течение ночи при 5,0% CO₂, 37°C. Уровень TNFα в надосадочной жидкости культуры клеток измеряли с применением наборов для выявления TNFα человека MSD Vplex. На фигуре 2 показано, что бивалентное антитело к TREM-1 является более активным, чем моновалентное антитело к TREM-1, и бивалентный мутеин IL-10 является более активным, чем моновалентный мутеин IL-10 на C-конце.

[0365] Эффекты IL-10, мутеина IL-10 и IL-10/антигенсвязывающих белков, связывающих TREM-1, в отношении активности иммунных клеток оценивали с применением анализа цельной крови. Аликвоты свежей гепаринизированной цельной крови человека, полученной от здоровых доноров, не получавших лекарственные препараты, помещали в 96-луночные планшеты с глубиной лунки 2,0 мл. Планшеты, содержащие кровь, уравнивали до 37°C в течение по меньшей мере 30 мин перед добавлением реагентов IL10. Указанные тестируемые реагенты подвергали серийному разбавлению и добавляли к цельной крови. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Затем планшеты помещали на лед и добавляли в них окрашивающие антитела к CD3 (клон UCST-1) и CD4 (клон RPA-T4) в течение 10-минутной инкубации. Затем клетки обрабатывали с помощью 1,4 мл буфера для фиксации/лизиса BD и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Клетки промывали с помощью 2% FCS/PBS до очистки от лизированных RBC. Для пермеабилзации клеток 200 мкл ледяного буфера BD Perm Buffer III добавляли к каждой лунке и тщательно перемешивали. После 5-кратной промывки к клеткам добавляли CD20 (клон H1), CD14 (клон RM052) и pSTAT3 pY705 (клон 4/P-STAT3). После инкубации на встряхивателе для планшетов при 200-300 об./мин в течение одного часа при температуре окружающей среды, покрыв алюминиевой фольгой для защиты от света, несвязанное антитело быстро удаляли посредством 2-кратной промывки с помощью 2% FCS/PBS. Клетки ресуспендировали в 200 мкл 2% FCS/PBS в качестве буфера для промывки и подвергали анализу FACS с применением проточного цитометра BD LSRII. В то время как IL-10 по отдельности индуцировал пролиферацию CD8⁺ Т-клеток и В-клеток, не наблюдали повышение уровня активации CD8⁺ Т-клеток и В-клеток, индуцированное мутеином IL-10 или антителом к TREM-1/мутеином IL-10, и Ab к TREM-1/мутеин IL-10 демонстрировали доказательство концепции эффекта нацеливания, специфичного в отношении типа клеток (фигура 3).

[0366] Оценивали ингибирование LPS-индуцированной выработки TNFα из моноцитов человека. Моноциты выделяли из замороженных PBMC с применением набора для выделения Miltenyi Monocyte Isolation Kit II. Очищенные моноциты высевали в полные среды при 10⁵ клеток на лунку в 96-луночный планшет с круглыми лунками, обработанный с помощью TC. Указанные тестируемые белки с различными мутеинами IL-10 подвергали серийному разбавлению 1:5 от 11000 пМ до 0,005 пМ. LPS добавляли к клеткам в конечной концентрации 10 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при 5,0% CO₂, 37°C. Уровень TNFα в надосадочной жидкости культуры клеток измеряли с применением наборов для выявления TNFα человека MSD Vplex. На фигурах 4А-4Н продемонстрировано, что антигенсвязывающие белки, содержащие разные мутеины IL-10,

являются более активными в отношении уменьшения количества TNF α в моноцитах по сравнению с культивированием с мутеином IL-10 по отдельности, что позволяет предположить, что связывание TREM-1 значительно усиливает подавление активации моноцитов с помощью мутеина IL-10.

[0367] Для оценки ингибирования LPS-индуцированной выработки TNF α человека в моноцитах человека моноциты выделяли из замороженных PBMC с применением набора для выделения Miltenyi Monocyte Isolation Kit II. Очищенные моноциты высевали в полные среды при 10^5 клеток на лунку в 96-луночный планшет с круглыми лунками, обработанный с помощью TC. Указанные тестируемые белки подвергали серийному разбавлению 1:5 от 11000 пМ до 0,005 пМ. LPS добавляли к клеткам в конечной концентрации 10 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при 5,0% CO₂, 37°C. Уровень TNF α в надосадочной жидкости культуры клеток измеряли с применением наборов для выявления TNF α человека MSD Vplex. Для оценки ингибирования LPS-индуцированной выработки TNF α мыши костный мозг мыши выделяли из бедренной кости мышей C57Bl/6. Клетки высевали в полные среды при 10^5 клеток на лунку в 96-луночный планшет с круглыми лунками, обработанный с помощью TC. Указанные тестируемые реагенты подвергали серийному разбавлению 1:5 от 11000 пМ до 0,005 пМ. LPS добавляли к клеткам в конечной концентрации 10 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при 5,0% CO₂, 37°C. Уровень TNF α мыши в надосадочной жидкости измеряли с применением наборов для выявления TNF α мыши MSD Vplex.

[0368] На фигуре 5 показано, что наблюдали значительное улучшение активности мутеина IL-10 в отношении ингибирования TNF α в моноцитах человека посредством связывания TREM-1 (фиг. 5A). Улучшение ингибирования TNF в отношении моноцитов зависит от связывания TREM-1, поскольку отмечается незначительная активность против моноцитов мыши вследствие отсутствия перекрестной реактивности с TREM-1 мыши (фиг. 5B).

[0369] Данные результаты демонстрируют, что антигенсвязывающий белок, содержащий мутеин IL-10 и фрагмент для нацеливания на иммунную клетку, например, антитело к TREM-1, обладает способностью дифференциально регулировать иммунные клетки по сравнению с IL-10 дикого типа. Антигенсвязывающий белок в значительной степени ингибирует выработку TNF- α из миелоидных клеток. Антигенсвязывающий белок не стимулирует CD8⁺ Т-клетки и В-клетки. Антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 обладает способностью подавлять воспаление без стимулирования иммунных клеток и, таким образом, может обеспечивать благоприятный терапевтический эффект в лечении воспалительного заболевания кишечника.

Пример 5. Конструирование стабильности IL-10M1

[0370] Для конструирования стабильности IL-10M1 с помощью дрожжевого дисплея (SEQ ID NO: 2211) с применением ненаправленного подхода получали библиотеку IL-10M1 на основе ПЦР с высокой частотой ошибок при условиях низкого уровня мутагенеза с применением набора GENEMORPH® II и отображали на поверхности

дрожжей (IL10M1-EP Library). Библиотека отображалась на поверхности производного дрожжей BJ5464, где IL-10M1 был слит с N-концом альфа-агглютина. Эффективность дисплея измеряли посредством связывания конъюгированного с ALEXAFLUOR® 647 антитела к НА. Библиотеки подвергали сортировке с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для высокого уровня связывания с конъюгированным с биотином рекомбинантным IL-10R-Fc с применением стрептавидина PE в качестве вторичного реагента для флуоресценции.

[0371] Для идентификации мутантных форм, которые показывали лучшие результаты, чем IL-10M1 дикого типа в стрессовых условиях, различные виды стрессового воздействия применяли в отношении данной дрожжевой библиотеки с высокой частотой ошибок. В качестве стресса для экспрессии белка индуцировали отображение мутантных вариантов IL-10M1 библиотекой дрожжевых клеток IL-10M1-EP при 20 или 30°C. Для идентификации мутантных форм, которые демонстрировали более высокую устойчивость к данному виду стресса, варианты, которые хорошо связывались с IL-10R-Fc и хорошо отображались на поверхности дрожжей (что оценивалось с помощью эпитопной метки НА), подвергали сортировке посредством FACS. Последовательности IL-10M1 из данных пулов обогащенных связывающих молекул наряду с исходным пулом библиотеки IL-10M1 EP амплифицировали с помощью праймеров за пределами кодирующей последовательности IL-10M1. Затем ампликоны обрабатывали с применением набора для получения библиотеки Nextera и подвергали анализу NGS на устройстве Illumina MiSeq в течение прогона 2x 300 п. о. Мутантные последовательности, которые являлись высокообогащенными или уровень которых снижался в пуле связывающих молекул после индукционного стресса при 30°C, отбирали для рекомбинантного получения и оценивали в отношении стабильности с целью оценки прогностической мощности подхода (таблица 15).

[0372] Для идентификации вариантов, которые могут лучше сворачиваться и меньше подвергаться воздействию протеолиза, проводили эксперименты на основе ограниченного протеолиза. Сначала библиотеку IL-10M1 с высокой частотой ошибок подвергали индуцированию при 20°C и подвергали сортировке посредством FACS для устранения связывающих молекул, отличных от IL10R. Таким образом получали библиотеку связывающих молекул IL-10M1 EP. Затем библиотеку связывающих молекул IL-10M1 EP подвергали индуцированию при 20°C и подвергали воздействию ограничивающих количеств трипсина, химотрипсина и термолизина. Для идентификации мутантных форм, которые демонстрируют более высокую устойчивость к воздействию данных протеаз, варианты, которые связывались с IL-10R-Fc и отображались на поверхности дрожжей лучше, чем исходная молекула IL-10M1, подвергали сортировке посредством FACS и анализировали посредством NGS, как описано выше. Мутантные последовательности, которые являлись высокообогащенными или уровень которых снижался в пулах, устойчивых к воздействию протеаз (например, обогащенные при белковом стрессе, обогащенные при температурном стрессе, обогащенные при

температурном и протеазном стрессе, сниженные при протеазном стрессе или сниженные при температурном стрессе), отбирали для рекомбинантного получения и оценивали в отношении стабильности с целью оценки прогностической мощности подхода (таблица 16).

[0373] Таблица 16. Отобранные с помощью дрожжевого дисплея мутации, влияющие на стабильность, и обоснование

Клон слияния TREM1-61B12-IL-10	SEQ ID NO:	Мутеин IL-10	SEQ ID NO:
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K130Q, K138D]	2137	huIL10[K130Q, K138D]	2138
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K130Q] a	2139	huIL10[K130Q]	2140
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D, K157N]	2141	huIL10[K138D, K157N]	2142
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D, M154V]	2143	huIL10[K138D, M154V]	2144
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D, N160D]	2145	huIL10[K138D, N160D]	2146
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D,линкер[G1A]]	2147	huIL10[K138D,линкер[G1A]]	2148
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D,линкер[G1V]]	2149	huIL10[K138D,линкер[G1V]]	2150
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K138D,линкер[G5A]]	2151	huIL10[K138D,линкер[G5A]]	2152
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K157N] b	2153	huIL10[K157N]	2154
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[M154V] a	2155	huIL10[M154V]	2156
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[N160D] a	2157	huIL10[N160D]	2158
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[линкер[G1A]] a	2159	huIL10[линкер[G1A]]	2160
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[линкер[G1V]] e	2161	huIL10[линкер[G1V]]	2162
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[линкер[G5A]] b	2163	huIL10[линкер[G5A]]	2164
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[A89P]b	2165	huIL10[A89P]b	2166
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[A89P, K138D]	2167	huIL10[A89P, K138D]	2168
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[E115K] a	2169	huIL10[E115K]	2170
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[E115K, K138D]	2171	huIL10[E115K, K138D]	2172
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[F56Y] b	2173	huIL10[F56Y]	2174
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[F56Y, K138D]	2175	huIL10[F56Y, K138D]	2176
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H109D] a	2177	huIL10[H109D]	217

			8
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H109D, K138D]	2179	huIL10[H109D, K138D]	2180
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H14Q, L46K]	2181	huIL10[H14Q, L46K]	2182
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H14Q, Q38E]	2359	huIL10[H14Q, Q38E]	2360
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H14Q] a	2361	huIL10[H14Q]	2362
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[H14Q, K138D]	2363	huIL10[H14Q, K138D]	2364
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K57N] b	2365	huIL10[K57N]	2366
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K57N, K138D]	2367	huIL10[K57N, K138D]	2368
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L112V] d	2369	huIL10[L112V]	2370
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L112V, K138D]	2371	huIL10[L112V, K138D]	2372
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, A89P]	2373	huIL10[L46K, A89P]	2374
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, E115K]	2375	huIL10[L46K, E115K]	2376
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, F56Y]	2377	huIL10[L46K, F56Y]	2378
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, H109D]	2379	huIL10[L46K, H109D]	2380
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K57N]	2381	huIL10[L46K, K57N]	2382
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, L112V]	2383	huIL10[L46K, L112V]	2384
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, L60Q]	2385	huIL10[L46K, L60Q]	2386
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, N116D]	2387	huIL10[L46K, N116D]	2388
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q63E]	2389	huIL10[L46K, Q63E]	2390
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q63L]	2391	huIL10[L46K, Q63L]	2392
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q70E]	2393	huIL10[L46K, Q70E]	2394
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q70K]	2395	huIL10[L46K, Q70K]	2396
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, R110P]	2397	huIL10[L46K, R110P]	2398
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, R110Q]	2399	huIL10[L46K, R110Q]	2400
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K]	2401	huIL10[L46K]	2402
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, линкер[G1V]]	2403	huIL10[L46K, линкер[G1V]]	2404

TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K,линкер[G5A]]	2405	huIL10[L46K,линкер[G5A]]	2406
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K130Q]	2407	huIL10[L46K, K130Q]	2408
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K157N]	2409	huIL10[L46K, K157N]	2410
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, M154V]	2411	huIL10[L46K, M154V]	2412
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, N160D]	2143	huIL10[L46K, N160D]	2414
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L60Q] c	2415	huIL10[L60Q]	2416
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L60Q, K138D]	2417	huIL10[L60Q, K138D]	2418
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[M22V, L46K]	2419	huIL10[M22V, L46K]	2420
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[M22V, Q38E]	2421	huIL10[M22V, Q38E]	2422
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[M22V] a	2423	huIL10[M22V]	2424
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[M22V, K138D]	2425	huIL10[M22V, K138D]	2426
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[N116D] b	2427	huIL10[N116D]	2428
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[N116D, K138D]	2429	huIL10[N116D, K138D]	2430
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, A89P]	2431	huIL10[Q38E, A89P]	2432
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, E115K]	2433	huIL10[Q38E, E115K]	2434
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, F56Y]	2435	huIL10[Q38E, F56Y]	2436
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, H109D]	2437	huIL10[Q38E, H109D]	2438
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, K57N]	2439	huIL10[Q38E, K57N]	2440
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, L112V]	2441	huIL10[Q38E, L112V]	2442
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, L60Q]	2443	huIL10[Q38E, L60Q]	2444
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, N116D]	2445	huIL10[Q38E, N116D]	2446
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, Q63E]	2447	huIL10[Q38E, Q63E]	2448
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, Q63L]	2449	huIL10[Q38E, Q63L]	2450
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, Q70E]	2451	huIL10[Q38E, Q70E]	2452
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, Q70K]	2453	huIL10[Q38E, Q70K]	2454
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, R110P]	2455	huIL10[Q38E, R110P]	245

			6
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, R110Q]	2457	huIL10[Q38E, R110Q]	2458
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E,линкер[G5A]]	2459	huIL10[Q38E,линкер[G5A]]	2460
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E,линкер[G1V]]	2461	huIL10[Q38E,линкер[G1V]]	2462
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E,линкер[G1A]]	2463	huIL10[Q38E,линкер[G1A]]	2464
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, K130Q]	2465	huIL10[Q38E, K130Q]	2466
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, K157N]	2467	huIL10[Q38E, K157N]	2468
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38E, M154V]	2469	huIL10[Q38E, M154V]	2470
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q63E] c	2471	huIL10[Q63E]	2472
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q63E, K138D]	2473	huIL10[Q63E, K138D]	2474
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q63L, Q138L]	2475	huIL10[Q63L, Q138L]	2476
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q63L, K138D]	2477	huIL10[Q63L, K138D]	2478
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q70E] a	2479	huIL10[Q70E]	2480
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q70E, K138D]	2481	huIL10[Q70E, K138D]	2482
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q70K] d	2483	huIL10[Q70K]	2484
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q70K, K138D]	2485	huIL10[Q70K, K138D]	2486
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[R110P] c	2487	huIL10[R110P]	2488
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[R110P, K138D]	2489	huIL10[R110P, K138D]	2490
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[R110Q] c	2491	huIL10[R110Q]	2492
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K120D]	2493	huIL10[K120D]	2494
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q63L] d	2495	huIL10[Q63L]	2496

Обоснование отбора: а, обогащенные при белковом стрессе; b, обогащенные при температурном стрессе; c, обогащенные при температурном и протеазном стрессе; d, сниженные при протеазном стрессе; e, сниженные при температурном стрессе

[0374] Конструирование стабильности с помощью Rosetta. Конструирование стабильности также изучали посредством разработки с помощью вычислительной техники. Структурное моделирование мутеинов IL10M1 выполняли с применением RosettaScripts и функции подсчета Talaris2014. С применением протокола "FastRelax" пять циклов минимизации остова и оптимизации ротамеров привели модели мономерных IL-

10M1, полученные из кристаллической структуры PDB 1Y6K, к минимуму локальной энергии. После релаксации остатки 21-161 подвергали индивидуальному скринингу и с помощью вычислительной техники подвергали мутации с получением каждой из 20 стандартных аминокислот. После этого следовали 50 стадий симуляционного отжига на основе Monte Carlo для пептидного остова и окружающих остатков. Все отобранные схемы также подвергали ремоделированию и оценивали на фоне мутации с аттенуацией L46K для подтверждения того, что на предсказанные характеристики не оказывалось влияние. В таблице 17 показаны SEQ ID NO для слияния мутеина IL10 с тяжелой цепью антитела 61B12; легкая цепь в каждом из них является такой же, как в антителе 61B12 (SEQ ID NO: 105, но без сигнальной последовательности).

[0375] Таблица 17. Клоны для изучения стабильности Rosetta

Клоны для конструирования стабильности с помощью Rosetta	АА слияния IL10-61B12 SEQ ID NO.	SEQ ID NO, АА мутеина IL10
huIL10[L46K]_моно_G4S_TREM1_61B12.001	2497	8
huIL10[L46K]_би_G4S_TREM1_61B12.001	2498	8
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[F15Y, L46K]	2499	2500
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[K40C, L46K, Y137C]	2501	2502
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, D84R]	2503	2504
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, E67C, V121C]	2505	2506
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, H90E]	2507	2508
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, H90Q]	2509	2510
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K49S]	2511	2512
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K49T]	2513	2514
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, K57C, M156C]	2515	2516
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, L103E]	2517	2518
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, M77R]	2519	2520
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, M77V]	2521	2522
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q79C, I136C]	2523	2524
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Q79R]	2525	2526

TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, S93E]	2527	2528
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, S93Q]	2529	2530
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, T100R]	2531	2532
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, Y59T]	2533	2534
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K, A127M]	2535	2536
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[L46K]_моно	2537	2538
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[Q38C, L46K, S141C]	2539	2540

[0376] Для отбора схем с улучшенной стабильностью и свойствами поверхности конечные модели ранжировали относительно друг друга с применением оценочной шкалы Talaris2014 и площади гидрофобной поверхности, доступной для растворителя (hSASA). 15 схем, получивших хорошую оценку, с низкими показателями энергии и уменьшенной hSASA в конечном итоге были отобраны для экспериментальной оценки (таблица 18).

[0377] **Таблица 18. Показатели оценки энергии Rosetta для 15 ведущих точечных мутаций**

Мутация	Общая оценка	Hsasa перечень
Y59T	-0,93	-52,55
M77R	-3,10	-51,16
M77V	-2,39	-53,92
D84R	-1,03	-44,39
H90E	-1,47	-38,28
H90Q	-0,69	-30,08
K49T	-0,83	-25,75
K49S	-0,63	-31,50
A127M	-0,65	-25,60
F15Y	-0,42	-23,10
S93E	-1,84	-19,97
S93Q	-1,25	-15,71
L103E	-0,87	-17,12
T100R	-1,19	-11,25
Q79R	-1,42	-10,33

[0378] С помощью альтернативной стратегии рациональной разработки изучали введение дисульфидных связей для стабилизации вынужденной мономерной структуры IL10M1. Для данного способа остатки 21-123 в шаблонной модели подвергали скринингу в отношении близкого расположения к остаткам 124-165. Пары остатков с помощью вычислительной техники подвергали мутации с получением цистеинов и принудительно получали дисульфидную связь, если атомы C β находились в пределах 6,5Å друг от друга. Данные схемы ранжировали относительно друг друга с применением оценочной шкалы Talaris2014 и невзвешенного потенциального параметра образования дисульфидной связи.

5 схем с перекрестным связыванием с низкими показателями энергии, таким образом, были отобраны для экспериментальной оценки (таблица 19).

[0379] Таблица 19. Показатели оценки энергии Rosetta для 5 ведущих мутаций, обеспечивающих образование дисульфидной связи

Мутация	Общая оценка	dsif_fa13
Q97C-I136C	5,62	-0,43
K57C-M156C	5,64	1,53
K40C-Y137C	5,69	-0,56
Q38C-S141C	6,27	-0,38
E67C-V121C	6,37	-0,43

[0380] Получение и тестирование в виде биспецифических слияний. Варианты мутеина, разработанные для повышения стабильности, клонировали как бивалентные С-концевые слияния в антитело к TREM1 61B2.001, рекомбинантно экспрессируемое в клетках CHO, и подвергали очистке, как описано в примере 3. Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии, и каждый вариант концентрировали до 10 ± 1 мг/мл с применением Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis Cassettes, 20K MWCO, 3 мл (ThermoFisher, номер по каталогу: 87735). Титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio OCTET® (Pall Life Sciences) с использованием сенсоров с белком А. Процентную долю присутствующего высокомолекулярного (% HMW) материала измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC), и % чистоты целевого белка измеряли посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях с применением LABCHIP® GXII (Perkin Elmer). Склонность к агрегации и стабильность мономера оценивали посредством стрессового воздействия на образцы при 40° С в течение 2 недель. Затем образцы, подвергнутые стрессовому воздействию, и образцы T0 анализировали посредством аналитической SEC для количественного определения повышения уровня агрегации (% HMW) и потери мономеров после стрессового воздействия по сравнению с T0. Биспецифическую функциональную активность измеряли посредством ингибирования выработки TNFα в стимулированных с помощью LPS PBMC с использованием подгруппы молекул, и результаты для выбранных молекул показаны в таблице 20.

[0381] Таблица 20. Данные по получению и стабильности для слияния сконструированных мутеинов IL-10M1 с антителом к TREM1 61B2

Название	Титр (мг/л)	Конечный выход (мг/л)	SEC pre-MP (%)	Чистота MCE NR (%)	Дельта % HMW (2 недели при 40C)	Дельта % главного пика (2 недели при 40C)
huIL10[L46K]_моно_G4S_TREM1_61B12.001	140	NA	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
huIL10[L46K]_би_G4S_TREM1_61B12.001	145	56	5,9	99,8	1,7	8,1
TREM1_61B12.001_G4S_huIL10[F15Y, L46K]	161	107	5,3	98,0	2,2	1,4

TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K40C, L46K, Y137C]	177	101	5,3	99,4	2,6	1,5
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, D84R]	198	NA	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, E67C, V121C]	147	NA	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, H90E]	171	121	6,6	98,8	1,8	0,6
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, H90Q]	158	38	5,5	99,2	1,3	0,5
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K49S]	181	121	7,3	99,3	0,8	-0,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K49T]	192	98	11,9	99,2	-2,9	-3,8
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K57C, M156C]	155	115	5,4	99,1	1,9	1,2
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, L103E]	163	147	3,9	99,4	0,6	0,2
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, M77R]	198	NA	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, M77V]	182	99	5,4	99,6	5,2	3,5
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q79C, I136C]	182	97	5,2	99,1	1,4	0,9
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q79R]	167	111	7,1	97,2	0,6	-0,1
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, S93E]	183	123	6,4	99,1	1,8	1,0
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, S93Q]	162	80	6,4	99,5	1,0	0,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, T100R]	169	NA	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Y59T]	163	100	5,5	99,4	0,1	0,0
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, A127M]	190	114	5,1	99,0	1,9	1,2
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K]_МОНО	163	67	2,7	66,7	1,1	0,7
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38C, L46K, S141C]	167	81	5,1	100,0	1,2	0,7
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K130Q, K138D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K130Q]	164	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K138D, K57N]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K138D, M154V]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K138D, N160D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.

IL10[K138D,линкер[G1A]]						
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K138D,линкер[G1V]]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K138D,линкер[G5A]]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K57N]	155	75	5,4	93,4	36,5	22,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[M154V]	173	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[N160D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[линкер[G1A]]	167	50	5,6	97,8	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[линкер[G1V]]	166	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[линкер[G5A]]	170	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[A89P]	163	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[A89P, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[E115K]	121	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[E115K, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[F56Y]	105	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[F56Y, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H109D]	139	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H109D, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H14Q, L46K]	139	68	5,9	99,1	3,5	2,1
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H14Q, Q38E]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H14Q]	141	62	4,6	99,7	8,7	4,8
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[H14Q, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K57N]	155	75	5,4	93,4	36,5	22,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K57N, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L112V]	156	26	5,7	97,5	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L112V, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, A89P]	167	80	7,1	96,7	3,3	1,8

TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, E115K]	155	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, F56Y]	136	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, H109D]	163	70	4,1	98,0	2,9	2,0
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K57N]	164	68	7,5	96,0	8,4	5,3
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, L112V]	157	63	7,1	99,3	7,5	№ значения!
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, L60Q]	164	30	7,7	97,8	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, N116D]	163	59	4,6	99,0	3,8	2,7
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q63E]	159	47	3,9	98,2	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q63L]	138	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q70E]	165	72	5,2	98,6	7,8	4,9
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, Q70K]	146	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, R110P]	157	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, R110Q]	154	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K]	172	53	6,0	99,8	3,3	2,5
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, линкер[G1V]]	167	37	5,9	99,3	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, линкер[G5A]]	171	80	6,1	97,5	4,1	1,8
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K130Q]	167	95	6,5	98,1	6,1	3,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, K157N]	0	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, M154V]	174	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L46K, N160D]	170	55	5,1	97,9	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L60Q]	168	62	6,4	98,0	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[L60Q, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[M22V, L46K]	168	73	6,3	96,3	4,8	19,6
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[M22V, Q38E]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[M22V]	170	56	5,3	98,1	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.

IL10[M22V, K138D]						
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[N116D]	159	61	4,8	97,7	12,1	7,4
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[N116D, K138D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, A89P]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, E115K]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, F56Y]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, H109D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, K57N]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, L112V]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, L60Q]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, N116D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, Q63E]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, Q63L]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, Q70E]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, Q70K]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, R110P]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, R110Q]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, линкер[G5A]]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, линкер[G1V]]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, линкер[G1A]]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, K130Q]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, K157N]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q38E, M154V]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q63E]	173	94	3,9	95,6	11,7	7,1
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q63E, K138D]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q63L, Q138L]	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.

TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q63L, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q70E]	168	90	4,7	97,6	27,2	17,2
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q70E, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q70K]	153	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[Q70K, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[R110P]	153	60	3,2	98,5	4,2	2,2
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[R110P, K138D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[R110Q]	152	91	3,6	96,7	8,4	5,1
TREM1_61B12.001_G4S_hu IL10[K120D]	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.

[0382] Данные результаты показывают, что подгруппа мутаций, влияющих на стабильность, обеспечивала снижение показателя агрегации для вариантов, представляющих собой слияние антител к TREM1-IL10M1/ антигенсвязывающий белок, во время очистки и через 2 недели стрессового воздействия при 40 градусах С в умеренно высоких концентрациях (10 мг/мл).

[0383] Лучшие мутации, влияющие на стабильность, объединяли с мутациями, разработанными для устранения "горячих точек" дезамидирования, в положениях N10, N116 и/или в первом положении линкера GGSGG между первым и вторым доменами IL10M1 (называемого далее линкером[G1]). Новые варианты IL10M1 подвергали бивалентному слиянию с тяжелой цепью антител к TREM1 63F8.001 и 64D7.001 в трех разных положениях: на N-конце, на C-конце или в погруженном положении между Fab и Fc.

[0384] Таблица 21. "Горячие точки" дезамидирования в мутеинах IL-10

Мутеин IL-10	SEQ ID NO:
HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	2777
HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	2778
HUIL10[L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	2779
HUIL10[L46K, R110P]	2780
HUIL10[N10I, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	2781
HUIL10[N10I, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	2782
HUIL10[N10I, L46K, L103E, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	2783
HUIL10[N10I, L46K, L103E]	2784
HUIL10[N10I, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	2785
HUIL10[N10K, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	2786
HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	2787
HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	2788
HUIL10[N10Q, L46K, L103E, N116Q]	2789
HUIL10[N10Q, L46K, L103E]	2790
HUIL10[N10Q, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	2791

[0385] С-концевые слияния IgG-цитокин экспрессировали в клетках CHO, подвергали очистке, концентрировали до 10 мг/мл и анализировали, как описано в примере 4.

[0386] N-концевые слияния цитокин-IgG конструировали посредством слияния IL-10M1 или сконструированных вариантов IL-10M1, за которыми следует 10-аминокислотный линкер с последовательностью GGGSGGGS (SEQ ID NO:2676), с N-концом тяжелой цепи антитела к TREM-1 SEFL2 IgG1z. Рекомбинантные конструкции экспрессии антитело-цитокин получали с применением клонирования Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих вариabельные домены антитела, 2) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих разработанный цитокин с линкером, 3) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены, и 4) остова вектора экспрессии млекопитающих. Слитые тяжелые цепи (HC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и легкие цепи (LC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Конструкции экспрессировали в клетках CHO, подвергали очистке, концентрировали до 10 мг/мл и анализировали, как описано в примере 4.

[0387] Погруженные молекулы Fab-цитокин-Fc конструировали посредством слияния IL-10M1 или сконструированных вариантов IL10M1 с ведущим линкером и хвостовым линкером с последовательностью GGGG (SEQ ID NO: 2677) с шарнирной областью антитела к TREM-1 SEFL2 IgG1z между аминокислотами C282 и D283 (т. е. EPSKC-GGGG-IL10M1-GGGG-DKTHC (SEQ ID NO: 2724). Рекомбинантные конструкции экспрессии Fab-цитокин-Fc получали с применением клонирования Golden Gate для сборки 1) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих вариabельные домены антитела, 2) синтетических ДНК-фрагментов, содержащих разработанный цитокин с линкерами, 3) предварительно клонированных "векторов экспрессии частей целевой молекулы", содержащих необходимые константные домены, и 4) остова вектора экспрессии млекопитающих. Слитые тяжелые цепи (HC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью пурамицина, и легкие цепи (LC) собирали в векторный остов с применением кассеты для отбора с помощью гигромицина. Конструкции экспрессировали в клетках CHO, подвергали очистке, концентрировали до 10 мг/мл и анализировали, как описано в примере 4.

[0388] Таблица 22. "Горячие точки" дезамидирования в мутеин IL-10-антитело к TREM-1

Клон слияния TREM1/IL-10	Расположение слияния	SEQ ID NO тяжелой цепи
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1V]]	С-конец	2726
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2727
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10K, L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2728

TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2729
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2730
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1V]]	С-конец	2731
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10K, L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2732
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2733
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[L46K, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2734
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2735
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]	С-конец	2736
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2737
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2738
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2739
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2740
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, R110P,линкер[G1A]]	С-конец	2741
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]	С-конец	2742
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]	С-конец	2743
huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_63F8.001	Н-конец	2744
huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	Н-конец	2745
huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_63F8.001	Н-конец	2746
huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	Н-конец	2747
huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_63F8.001	Н-конец	2748
huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	Н-конец	2749
huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_63F8.001	Н-конец	2750
huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	Н-конец	2751
huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_63F8.001	Н-конец	2752
huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	Н-конец	2753
huIL10[N10Q, L46K,	Н-конец	2754

L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_63F8.001		
huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1V]]_2xG4S_TREM1_64D7.001	N-конец	2755
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2756
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2757
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2758
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2759
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2760
TREM1_63F8.001_Fab_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2761
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[L46K, R110P]	C-конец	2762
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]	C-конец	2763
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E]	C-конец	2764
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E, N116Q]	C-конец	2765
TREM1_63F8.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E]	C-конец	2766
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2767
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2768
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2769
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[N10I, L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2770
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1A]]_Fc	Погруженное	2771
TREM1_64D7.001_Fab_huIL10[N10Q, L46K, L103E,линкер[G1V]]_Fc	Погруженное	2772
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[L46K, R110P,линкер[G1A]]	C-конец	2773
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[L46K, R110P]	C-конец	2774
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10I, L46K, L103E]	C-конец	2775
TREM1_64D7.001_G4S_huIL10[N10Q, L46K, L103E]	C-конец	2776

[0389] Тяжелые цепи в таблице 22 сочетали с их соответствующими партнерами-легкими цепями, например, SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554 для клона 63F8.001 (но без сигнальной последовательности MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 2674) и SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555 для 64D7.001 (но без сигнальной последовательности MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 2674)). Были идентифицированы несколько комбинаций мутаций IL-10M1, которые обеспечивали

исправление сайтов дезамидирования и сохранение низкого показателя агрегации через 10 дней стрессового воздействия при 40°C в умеренно высоких концентрациях (10 мг/мл).

[0390] Таблица 23. Данные по получению и стабильности для антигенсвязывающих белков на основе сконструированных мутеинов IL-10M1, соединенных с антителами к TREM1 63F8 и 64D7

Название	Ти тр (мг /л)	Кон ечн ый вых од (мг/ л)	SE C pre- MP (%)	%НМW, определе нный посредст вом SEC	Чис тота МС Е NR (%)	Дел ьта % НМ W (2 неде ли при 40С)	Дель та % глав ного пика (2 неде ли при 40С)
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	305	415	97	2,79	98	3,4	1,07
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	325	430	96,8	2,94	97	3,4	0,96
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10K, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	303	405	96,3	3,32	97	3,8	1,32
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10I, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	315	339	99	0,89	98	7,2	0,75
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	309	312	93,9	1,35	97	5	0,43
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	331	318	98,6	1,33	97	10,2	0,51
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10K, L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	285	295	97,6	2,17	96	11,1	0,66
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	268	358	97,9	1,95	99	1,7	0,22
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	309	463	98	1,86	98	2,1	0,59
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10I, L46K, L103E, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	303	444	97,8	2,02	98	2,1	0,54
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	298	443	98,2	1,61	98	2,7	1,04
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[N10I, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	292	408	97,6	2,22	98	2,5	0,64
TREM1_63F8.001_G4S_HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	307	443	98,1	1,64	98	3,2	1,3
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10I, L46K, L103E, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	329	384	98,8	1,12	99	2,5	-0,1
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10I, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	356	377	98,6	1,39	98	3	0,04
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[N10Q, L46K, R110P,ЛИНКЕР[G1A]]	232	242	98,9	1,01	99	3,6	-0,03

TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1A]]	341	370	98,6	1,26	98	9	0,33
TREM1_64D7.001_G4S_HUIL10[L46K, L103E,ЛИНКЕР[G1V]]	321	363	98,6	1,26	98	9	0,4

[0391] Аффинность выбранных слитых белков для TREM1 человека и TREM1 яванского макака измеряли посредством анализа BIACORE™ (BIACORE™ T200, сенсорный чип: SCM5). Условия для BIACORE™ предусматривают приведенное ниже. Образцы: диапазон 0,244 нМ-500 нМ для титрования IL10/TREM1; ассоциация: 3 минуты при 50 мкл/мин; диссоциация: 15 минут для IL-10 и 30 минут для TREM1 при 50 мкл/мин; регенерация: 10 мМ глицина, pH 1,5 при 30 мкл/мин в течение 30 с (2х).

[0392] Аффинность измеряли по сравнению с белком huIL10R-альфа № 274 из клеток, стабильно трансфицированных Sf 21, и белком huIL10R-альфа № 9100, экспрессируемого в клетках HEK293 человека. Результаты представлены в таблице 24.

[0393] Таблица 24. Результаты анализа аффинности BIACORE™ для выбранных слитых белков для TREM-1 человека, TREM-1 яванского макака или IL-10R

Образец	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)	Лиганд	Модель
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 Q38E	4,78E+05	1,76E-02	3,68E-08	103,1	5,23	huIL10R 274	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 64D7 G4S huIL10M1 L46K	2,92E+05	1,62E-02	5,55E-08	145,1	10	huIL10R 274	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 L46K	3,42E+05	1,93E-02	5,63E-08	139,9	8,84	huIL10R 274	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 63F8 G4S huIL10M1 L46K	3,21E+05	1,85E-02	5,78E-08	135,3	9,31	huIL10R 274	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 Q38E	1,25E+05	2,09E-02	1,67E-07	103,5	1,83	huIL10R 9100	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 L46K	8,23E+04	1,86E-02	2,25E-07	121,7	2,16	huIL10R 9100	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 64D7 G4S huIL10M1 L46K	1,08E+05	2,61E-02	2,43E-07	124,1	2,35	huIL10R 9100	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 63F8 G4S huIL10M1 L46K	1,30E+05	3,16E-02	2,43E-07	119,7	2,35	huIL10R 9100	Связывание 1:1
Образец	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)	Лиганд	Модель
Белок IgG к huTREM1 64D7	3,18E+05	5,84E-05	1,84E-10	96,1	11	ECD huTREM1	Связывание 1:1

G4S huIL10M1 L46K							
Белок IgG к huTREM1 63F8 G4S huIL10M1 L46K	3,66E+05	7,92E-05	2,17E-10	133,7	16,3	ECD huTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 L46K	1,69E+05	3,77E-05	2,23E-10	114,1	11,4	ECD huTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 Q38E	1,63E+05	3,73E-05	2,29E-10	89,3	5,2	ECD huTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 64D7 G4S huIL10M1 L46K	1,86E+05	1,59E-04	8,51E-10	91,8	8,02	ECD cyTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 Q38E	1,78E+05	2,03E-04	1,14E-09	90,1	4,91	ECD cyTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 61B12 G4S huIL10M1 L46K	1,78E+05	2,24E-04	1,25E-09	110,5	8,92	ECD cyTREM1	Связывание 1:1
Белок IgG к huTREM1 63F8 G4S huIL10M1 L46K	3,75E+05	5,26E-04	1,40E-09	133,6	10,6	ECD cyTREM1	Связывание 1:1

[0394] HuTREM1 и супоTREM1 демонстрируют плотное и стабильное связывание с выбранными слитыми молекулами. Из 2 протестированных huIL10R huIL10R 274 продемонстрировал более сильное связывание (10-кратная разница) по сравнению с версией 9100. IL10 R 274 был выбран для будущего тестирования.

Пример 6. Эффективность антител к TREM-1 в отношении блокирования опосредованной лигандом передачи сигнала в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека

[0395] Антитела к TREM-1 тестировали в отношении способности блокировать передачу сигнала посредством ингибирования связывания лиганда с рецептором TREM-1 в PBMC человека. Замороженные PBMC человека (IQ Biosciences) размораживали, промывали и ресуспендировали в полной среде для культивирования клеток (RPMI/10% FBS/2 mM GlutaMax/1 mM пирувата натрия/44 мкМ β-меркаптоэтанола/1X ДНКазы I). PBMC высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток при 100000/луночка и оставляли для уравнивания в течение по меньшей мере 30 минут при 37°C. Тринадцать антител к TREM-1 разбавляли (3X серийное разбавление) в RPMI/10% FBS с получением конечных концентраций антител в диапазоне от 0,000017 нМ до 3 нМ. Антитело 57F5 было исключено из данного анализа, поскольку в ходе предыдущих

итераций данного анализа, где применяли более высокие концентрации антитела, ему не удавалось продемонстрировать какое-либо ингибирование передачи сигнала. Антитела предварительно инкубировали с PBMC в течение 30 минут перед добавлением лиганда TREM-1. Белок распознавания пептидогликана 1 (PGLYRP1) в комплексе с пептидогликаном (PGN) представляет собой один из нескольких описанных лигандов TREM-1, взаимодействие которых с рецептором TREM-1 запускает выработку воспалительных цитокинов (например, TNF α), и был использован в данных анализах. Для образования комплекса белков PGLYRP1 человека (R&D Systems) объединяли с растворимым PGN, полученным из E. coli (InvivoGen), в соотношении 1,25:2 и инкубировали в течение 45 минут при 37°C. Комплекс PGLYRP1/PGN добавляли к PBMC/антителу и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день клеточную среду собирали и анализировали в отношении TNF α посредством анализа сближения TNF α AlphaLisa для человека (Perkin Elmer). Излучение при 615 нм измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision 2103. Значения IC50 рассчитывали с применением GraphPad Prism (версия 8.4.3), и они представлены для двух отдельных анализов в таблице 25 ниже.

[0396] Таблица 25. Ингибирование антителом к TREM-1 опосредованной лигандом передачи сигнала в PBMC человека, как измерено с помощью высвобождения TNF α

ID антитела	Ab IC50-PBMC человека (испытание 1) пМ	Ab IC50-PBMC человека (испытание 2) пМ
57C10	8,8	7,2
30H2	6,9	н. о.
61B12	8,0	н. о.
61G5	10,2	2,7
63F8	3,8	3,1
64D7	4,3	2,4
34D1	10,0	6,9
44A5	3,5	6,1
46H7	6,3	4,4
49A2	3,1	3,3
66B8	31,6	н. о.
50A12	3,3	3,6
57F5	н. о.	н. о.
3E12	отсутствие ингибирования	н. о.

[0397] Данные результаты показывают, что антитела к TREM-1 связывают TREM-1 человека и, что важно, демонстрируют ингибирование индуцированной лигандом активации TREM-1 в первичных клетках человека (PBMC).

Пример 7. Эффективность антител к TREM-1 в отношении блокирования опосредованной лигандом передачи сигнала в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) яванского макака

[0398] Антитела к TREM-1 анализировали в отношении блокирования передачи сигнала посредством ингибирования связывания лиганда с рецептором TREM-1 в PBMC яванского макака. Замороженные PBMC яванского макака (IQ Biosciences) размораживали, промывали и ресуспендировали в полной среде для культивирования клеток (RPMI/10% FBS/2 mM GlutaMax/1 mM пирувата натрия/44 мкМ β -меркаптоэтанола/1X ДНКазы I). PBMC высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток при 100000/луночка и оставляли для уравнивания в течение по меньшей мере 30 минут при 37°C. Четырнадцать антител к TREM-1 разбавляли (3X серийное разбавление) в RPMI/10% FBS с получением конечных концентраций антител в диапазоне от 0,00017 нМ до 30 нМ. Антитела предварительно инкубировали с PBMC в течение 30 минут перед добавлением лиганда TREM-1. Белок распознавания пептидогликана 1 (PGLYRP1) в комплексе с пептидогликаном (PGN) представляет собой один из нескольких описанных лигандов TREM-1, взаимодействие которых с рецептором TREM-1 запускает выработку воспалительных цитокинов (например, TNF α), и был использован в данном анализе. Для образования комплекса белков PGLYRP1 яванского макака (Creative Biomart) объединяли с растворимым PGN, полученным из *E. coli* (InvivoGen), в соотношении 1,25:2 и инкубировали в течение 45 минут при 37°C. Комплекс PGLYRP1/PGN добавляли к смеси PBMC/антитело и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день клеточную среду собирали и анализировали в отношении TNF α посредством анализа сближения Сунпо TNF α AlphaLisa (Perkin Elmer). Излучение при 615 нм измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision 2103. Значения IC50 рассчитывали с применением GraphPad Prism (версия 8.4.3), и они представлены для двух отдельных анализов в таблице 26.

[0399] Таблица 26. Ингибирование антителом к TREM-1 опосредованной лигандом передачи сигнала в PBMC яванского макака, как измерено с помощью высвобождения TNF α

ID антитела	Ab IC50-PBMC яванского макака (испытание 1) пМ	Ab IC50-PBMC яванского макака (испытание 2) пМ
57C10	153,8	28,4
30H2	3768	отсутствие ингибирования
61B12	46,9	17,4
61G5	отсутствие ингибирования	2338
63F8	22,6	16,1
64D7	6939	780,5
34D1	100,1	16,2
44A5	57,9	9,1
46H7	95,1	9,7
49A2	731,5	265,7
66B8	113,9	23,2
50A12	2005	н. о.
57F5	отсутствие ингибирования	н. о.
3E12	отсутствие ингибирования	отсутствие ингибирования

[0400] Данные результаты показывают, что антитела к TREM-1 связывают TREM-1 яванского макака и, что важно, ингибируют индуцированную лигандом активацию TREM-1 в первичных клетках яванского макака (PBMC). Кроме того, на фигуре 6 проиллюстрировано ингибирование антителами к TREM1 опосредованной PGLYRP1/PGN передачи сигнала с участием TREM1 как в PBMC яванского макака, так и в PBMC человека.

Пример 8. Эффективность Fab к TREM-1 в отношении блокирования фосфорилирования тирозинкиназы селезенки (SYK) в линии клеток HEK293 человека, сверхэкспрессирующих TREM-1/Dap12.

[0401] Fab к TREM-1 анализировали в отношении способности блокировать передачу сигнала посредством ингибирования связывания лиганда с рецептором TREM-1 в линии клеток, сверхэкспрессирующих TREM-1/Dap12 человека, и определяли IC50. Фосфорилирование тирозинкиназы селезенки (SYK) представляет собой раннюю стадию в сигнальном каскаде TREM-1 и в данном анализе применяется в качестве меры передачи сигнала TREM-1. Клетки HEK293, которые сверхэкспрессируют TREM-1 человека и его облигатный адаптерный белок активации DNAX размером 12 кДа (Dap12), высевали в планшеты CellBIND (Corning) при 50000/лунка в полные среды (DMEM/10%FBS) и оставляли для прикрепления в течение ночи. Бивалентные антитела к TREM-1 не были способны ингибировать передачу сигнала в данной системе, вероятно, вследствие технического артефакта, представляющего собой высокую распространенность рецепторов TREM-1 в данных клетках и способность бивалентных антител осуществлять их перекрестное связывание, что приводит к независимому от лигандов агонизму рецепторов. Таким образом, моновалентные Fab применяли в качестве суррогатов для полных антител в данном анализе. Четырнадцать Fab к TREM-1 разбавляли (3X серийное разбавление) в полных средах с получением конечных концентраций антител в диапазоне от 0,00017 нМ до 30 нМ. Fab предварительно инкубировали с TREM-1/Dap12-HEK293 в течение 30 минут перед добавлением лиганда TREM-1 в виде комплекса PGLYRP1 человека (R&D Systems) и растворимого PGN из *E. coli* (InvivoGen). Для образования комплекса PGLYRP1 и PGN белки объединяли в соотношении 1:2 и инкубировали при 37°C в течение 45 минут перед добавлением к клеткам/Fab. Через один час инкубирования при комнатной температуре клетки подвергали лизису, и количество фосфорилированной SYK в клеточном лизате измеряли с применением анализа pSYK ALPHALISA® SUREFIRE® Ultra™ p-SYK (Tyr525/526) (Perkin Elmer). Излучение при 615 нм измеряли с применением многоканального планшет-ридера Envision 2103. Значения IC50 рассчитывали с применением GraphPad Prism (версия 8.4.3), и они представлены для двух отдельных анализов, как показано в таблице 27.

[0402] Таблица 27. Ингибирование антителом опосредованной лигандом передачи сигнала в линии клеток, сверхэкспрессирующих TREM-1/DAP12 человека, как измерено с помощью фосфорилирования SYK

ID Fab	Fab IC50-анализ pSYK (испытание 1) пМ	Fab IC50-анализ pSYK (испытание 2) пМ
Fab 57C10	273,4	582,9
Fab 30H2	467,2	374,5
Fab 61B12	112,0	568,8
Fab 61G5	387,0	186,4
Fab 63F8	45,2	38,0
Fab 64D7	229,1	70,0
Fab 34D1	313,8	309,2
Fab 44A5	188,9	325,0
Fab 46H7	43,3	116,9
Fab 49A2	1175	786,9
Fab 66B8	4662	н. о.
Fab 50A12	2850	н. о.
Fab 57F5	отсутствие ингибирования	н. о.
Fab 3E12	отсутствие ингибирования	н. о.

[0403] На фигуре 7 представлен график, на котором показано, что Fab к TREM1 ингибируют PGLYRP1/PGN-опосредованное фосфорилирование SYK в клетках HEK293 TREM1/DAP12.

[0404] Любой вариант осуществления в данном документе может быть дополнен одним или несколькими элементами из одного или нескольких других вариантов осуществления в данном документе.

[0405] Таким образом, понятно, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает все модификации, которые находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения; вышеуказанным описанием; следующими пронумерованными параграфами и/или показано в прилагаемых графических материалах.

[0406] Примеры вариантов осуществления.

[0407] Параграф 1. Мутеин интерлейкина-10 (IL-10) человека, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2, где указанный мутеин IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей АВ, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали А, спирали В, спирали С, спирали D, спирали Е и/или спирали F.

[0408] Параграф 2. Мутеин IL-10 согласно параграфу 1, предусматривающий по меньшей мере одну мутацию в спирали А.

[0409] Параграф 3. Мутеин IL-10 согласно параграфу 1, предусматривающий по меньшей мере одну мутацию в спирали F.

[0410] Параграф 4. Мутеин IL-10 согласно параграфу 1, предусматривающий по меньшей мере одну мутацию в петле спиралей АВ.

[0411] Параграф 5. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-4, предусматривающий мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20,

M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, или N160 в SEQ ID NO: 2 или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0412] Параграф 6. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-5, где указанный мутеин на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2.

[0413] Параграф 7. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-6, где мутация представляет собой одну или несколько из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ ID NO: 2, необязательно предусматривающий добавление 6 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0414] Параграф 8. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-7, где мутеин IL-10 снижает степень подавления выработки TNF-альфа в моноцитах, снижает уровни стимуляции CD8⁺ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток у субъекта-человека.

[0415] Параграф 9. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 5-7, где аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676).

[0416] Параграф 10. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-9, где мутеин IL-10 имеет аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 3-10 или SEQ ID NOS: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, и 2777-2791.

[0417] Параграф 11. Мутеин человеческого интерлейкина-10 (IL-10), содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, где указанный мутеин IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127,

K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, или N160 в SEQ ID NO: 2.

[0418] Параграф 12. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-11, дополнительно содержащий фрагмент, увеличивающий период полужизни.

[0419] Параграф 13. Мутеин IL-10 согласно параграфу 12, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой Fc-домен.

[0420] Параграф 14. Мутеин IL-10 согласно параграфу 13, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль (PEG).

[0421] Параграф 15. Мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-14, где мутеин представляет собой димер.

[0422] Параграф 16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-15.

[0423] Параграф 17. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 16, функционально связанный с последовательностью для контроля экспрессии.

[0424] Параграф 18. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту согласно параграфу 16 или вектор согласно параграфу 17.

[0425] Параграф 19. Клетка-хозяин согласно параграфу 18, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

[0426] Параграф 20. Клетка-хозяин согласно параграфу 18 или 19, где клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[0427] Параграф 21. Способ применения клетки-хозяина согласно любому из параграфов 18-20 для получения мутеина IL-10, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение мутеина IL-10.

[0428] Параграф 22. Мутеин IL-10, полученный способом согласно параграфу 21.

[0429] Параграф 23. Фармацевтическая композиция, содержащая мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0430] Параграф 24. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

а. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

б. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

с. содержит переменный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

d. содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0431] Параграф 25. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 24, где

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 110, 150, 170 или 290;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 111, 151, 171 или 291;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO 32, 52, 72, 112, 152, 172 или 292;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 116, 156, 176 и 296 ;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 117, 157, 177 и 297; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 118, 158 и 298.

[0432] Параграф 26. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 24 или параграфу 25, где

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 50 или 110;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 51 или 111;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 52 или 112;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 56 или 116;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 57 или 117; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 58 или 118

[0433] Параграф 27. Антигенсвязывающий белок согласно параграфам 24-26, содержащий набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); или

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0434] Параграф 28. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-27, содержащий набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3); или

vii) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3).

[0435] Параграф 29. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-28, содержащий набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3); и SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3).

[0436] Параграф 30. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-29, содержащий

a. варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185; или

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

b. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186; или

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

[0437] Параграф 31. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-30, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0438] Параграф 32. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-31, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302.

[0439] Параграф 33. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-32, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62 и 122.

[0440] Параграф 34. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-33, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0441] Параграф 35. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-34, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301.

[0442] Параграф 36. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-35, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61 и 121.

[0443] Параграф 37. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-36, содержащий

i) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 41, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 42;

ii) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62;

iii) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 81, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 82;

iv) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 101, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 102;

v) вариабельный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 121, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 122;

vi) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 141, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 142;

vii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 162;

viii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 182;

ix) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 201, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 202;

x) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 221, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 222;

xi) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 241, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 242;

xii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 261, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 262;

xiii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 281, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 282;

xiv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 302; или

xv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 2185, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 2186.

[0444] Параграф 38. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-37, содержащий

i) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 41, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 42;

ii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62;

iii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 81, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 82;

iv) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 121, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 122;

v) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 161, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 162;

vi) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 181, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 182; или

vii) переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 301, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 302.

[0445] Параграф 39. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-38, содержащий переменный домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 61, и переменный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 62; или переменный

домен легкой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 121, и вариабельный домен тяжелой цепи, изложенный под SEQ ID NO: 122.

[0446] Параграф 40. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-39, где одна или несколько аминокислот каркаса тяжелой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека.

[0447] Параграф 41. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-40, где одна или несколько аминокислот каркаса легкой цепи антигенсвязывающего белка замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека.

[0448] Параграф 42. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-41, где тяжелая цепь содержит константную область, выбранную из константных областей тяжелой цепи IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагментов, их комбинаций и их модификаций, где от одной до десяти аминокислот каркаса тяжелой цепи замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека.

[0449] Параграф 43. Антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с TREM-1 человека, имеющим последовательность под SEQ ID NO: 20, с антигенсвязывающим белком согласно любому из параграфов 24-42.

[0450] Параграф 44. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-43, где антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, Fab, F(ab')₂, Fab₂, моновалентного IgG, scFv, scFv-Fc, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[0451] Параграф 45. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 44, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело IgG1.

[0452] Параграф 46. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 44 или 45, где антигенсвязывающий белок представляет собой моновалентный IgG.

[0453] Параграф 47. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 44-46, где антигенсвязывающий белок представляет собой человеческое антитело.

[0454] Параграф 48. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-47, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186, и аминокислотную последовательность легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0455] Параграф 49. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-48, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186, и

аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0456] Параграф 50. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-49, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302.

[0457] Параграф 51. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-50, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 62 и 122.

[0458] Параграф 52. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-51, содержащий аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301.

[0459] Параграф 53. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 24-52, содержащий аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 61 и 121.

[0460] Параграф 54. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь согласно любому из параграфов 24-53.

[0461] Параграф 55. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь согласно любому из параграфов 24-53.

[0462] Параграф 56. Молекула нуклеиновой кислоты согласно параграфу 54, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь согласно любому из параграфов 24-53.

[0463] Параграф 57. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 54-56, где нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи, изложена под SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183, и нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи, изложена под SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

[0464] Параграф 58. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 54-57, функционально связанный с последовательностью для регуляции экспрессии.

[0465] Параграф 59. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 54; или молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 55; или молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 54 и молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 55; или молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 56 или параграфу 57; или вектор согласно параграфу 58.

[0466] Параграф 60. Клетка-хозяин согласно параграфу 59, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

[0467] Параграф 61. Клетка-хозяин согласно параграфу 59 или 60, где клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[0468] Параграф 62. Способ применения клетки-хозяина согласно любому из параграфов 59-61 для получения антигенсвязывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение указанного антигенсвязывающего белка.

[0469] Параграф 63. Антигенсвязывающий белок, полученный способом согласно параграфу 62.

[0470] Параграф 64. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно любому из параграфов 24-53 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0471] Параграф 65. Антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где

a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела,

b. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным,

c. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 1, и

d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом.

[0472] Параграф 66. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 65, где по меньшей мере один фрагмент IL-10 слит с С-концом антигенсвязывающего фрагмента.

[0473] Параграф 67. Антигенсвязывающий белок, содержащий

(a) полипептидную последовательность, имеющую формулу A-L-M или M-L-A, где

i) A представляет собой тяжелую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,

ii) L представляет собой линкерный пептид, содержащий от 4 до 20 аминокислот, и

iii) M представляет собой мутеин IL-10, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с IL-10 wt, изложенным под SEQ ID NO: 2, и

(b) легкую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,

где тяжелая цепь иммуноглобулина из (a) и легкая цепь иммуноглобулина из (b) образуют фрагмент антитела IgG, который связывает TREM-1, где белок содержит одну или две молекулы полипептида из (a) и одну или две молекулы легкой цепи из (b), где необязательно только 1 полипептид из (a) содержит фрагмент M.

[0474] Параграф 68. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-67, где

a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, и

b. фрагмент IL-10 слит с каждой тяжелой цепью антитела.

[0475] Параграф 69. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-68, где каждый фрагмент IL-10 представляет собой мономер.

[0476] Параграф 70. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-69, где

а. каждый фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и

б. каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей АВ, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали А, спирали В, спирали С, спирали D, спирали Е и/или спирали F.

[0477] Параграф 71. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 70, где по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали А.

[0478] Параграф 72. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 70, где по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в спирали F.

[0479] Параграф 73. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 70, где по меньшей мере один фрагмент IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию в петле спиралей АВ.

[0480] Параграф 74. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-73, где антигенсвязывающий белок подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках.

[0481] Параграф 75. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-74, где антигенсвязывающий белок на основе мутеина IL-10 подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках, однако по-прежнему не характеризуется активацией CD8⁺ Т-клеток и В-клеток.

[0482] Параграф 76. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-75, где каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157, или N160 в SEQ ID NO: 2 или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0483] Параграф 77. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-76, где каждый фрагмент IL-10 на по меньшей мере 95% идентичен аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2.

[0484] Параграф 78. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-77, где каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K,

N116D, N116Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E.

[0485] Параграф 79. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 76-78, где аминокислоты между спиралью D и спиралью E представляют собой GGGSGG (SEQ ID NO: 2676).

[0486] Параграф 80. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-79, где фрагмент IL-10 имеет аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 3-10 или SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, и 2777-2791.

[0487] Параграф 81. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-80, где

- а. антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере один линкер, слитый с по меньшей мере одним С-концом антигенсвязывающего фрагмента, и
- б. фрагмент IL-10 ковалентно связан с С-концом каждого линкера.

[0488] Параграф 82. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 81, где длина линкера составляет от 4 до 18 аминокислот.

[0489] Параграф 83. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 81 или 82, где длина линкера составляет шесть аминокислот.

[0490] Параграф 84. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-83, дополнительно содержащий константную область тяжелой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области тяжелой цепи.

[0491] Параграф 85. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-84, дополнительно содержащий константную область легкой цепи человека, присоединенную к указанной вариабельной области легкой цепи.

[0492] Параграф 86. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027,

1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085.

[0493] Параграф 87. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-86, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0494] Параграф 88. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-87, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0495] Параграф 89. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007.

[0496] Параграф 90. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85 или 89, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580,

2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, и 2605.

[0497] Параграф 91. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85 или 88-90, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007,, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, и 2605.

[0498] Параграф 92. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135.

[0499] Параграф 93. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85 или 92, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

[0500] Параграф 94. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-85 или 92-93, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323,

2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

[0501] Параграф 95. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-84, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, Fab, F(ab')₂, Fab2, моновалентного IgG, scFv, scFv-Fc, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[0502] Параграф 96. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-95, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG.

[0503] Параграф 97. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-96, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1.

[0504] Параграф 98. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-97, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моновалентный IgG.

[0505] Параграф 99. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-98, где константная область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента выбрана из константных областей тяжелой цепи IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагментов, их комбинаций и их модификаций, где от одной до десяти аминокислот каркаса тяжелой цепи замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой константной области антитела человека.

[0506] Параграф 100. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-99, где антигенсвязывающий фрагмент связывается с PD-1 человека, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

[0507] Параграф 101. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-99, где антигенсвязывающий фрагмент связывается с TREM-1 человека, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20.

[0508] Параграф 102. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-99 или 101, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержащий

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2190;

iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

[0509] Параграф 103. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-102, где

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 30, 50, 70, 110, 150, 170 или 290;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 31, 51, 71, 111, 151, 171 или 291;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO 32, 52, 72, 112, 152, 172 или 292;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 36, 56, 76, 116, 156, 176 и 296;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 37, 57, 77, 117, 157, 177 и 297; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 38, 58, 78, 118, 158, 178 и 298.

[0510] Параграф 104. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-103, где

a. последовательность CDR1 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 50 и 110;

b. последовательность CDR2 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 51 и 111;

c. последовательность CDR3 легкой цепи изложена под SEQ ID NO: 52 и 112;

d. последовательность CDR1 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 56 и 116;

e. последовательность CDR2 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 57 и 117; и

f. последовательность CDR3 тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 58 и 118.

[0511] Параграф 105. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-104, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержащий набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); или

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

[0512] Параграф 106. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-105, где антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности,

выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

[0513] Параграф 107. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-106, где антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186.

[0514] Параграф 108. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-107, где антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185.

[0515] Параграф 109. Антигенсвязывающий белок, выбранный из любого из параграфов 101-108, где одна или несколько аминокислот каркаса тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента, связывающего TREM-1, замещены соответствующей(-ими) аминокислотой(-ами) из другой аминокислотной последовательности антитела человека.

[0516] Параграф 110. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-109, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 122, 162, 182 и 302, и аминокислотную последовательность легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 121, 161, 181 и 301.

[0517] Параграф 111. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-110, где

а. антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи;
 б. каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи;

с. каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085; и

д. каждая легкая цепь-фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

[0518] Параграф 112. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-111, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелая цепь-фрагмент IL-10, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2137, 2139, 2141, 2143, 2145, 2147, 2149, 2151, 2153, 2155, 2157, 2159, 2161, 2163, 2165, 2167, 2169, 2171, 2173, 2175, 2177, 2179, 2181, 2359, 2361, 2363, 2365, 2367, 2369, 2371, 2373, 2375, 2377, 2379, 2381, 2383, 2385, 2387, 2389, 2391, 2393, 2395, 2397, 2399, 2401, 2403, 2405, 2407, 2409, 2411, 2413, 2415, 2417, 2419, 2421, 2423, 2425, 2427, 2429, 2431, 2433, 2435, 2437, 2439, 2441, 2443, 2445, 2447, 2449, 2451, 2453, 2455, 2457, 2459, 2461, 2463, 2465, 2467, 2469, 2471, 2473, 2475, 2477, 2479, 2481, 2483, 2485, 2487, 2489, 2491, 2493, 2495, 2497, 2498, 2499, 2501, 2503, 2505, 2507, 2509, 2511, 2513, 2515, 2517, 2519, 2521, 2523, 2525, 2527, 2529, 2531, 2533, 2535, 2537, 2539 и 2726-2776.

[0519] Параграф 113. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-111, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелая цепь-фрагмент IL-10, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2727-2732.

[0520] Параграф 114. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 113, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2727

или 2728 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554.

[0521] Параграф 115. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 113, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2729, 2730, 2731 или 2732 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555.

[0522] Параграф 116. Антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 101-115, где антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание лиганда TREM-1 с TREM-1.

[0523] Параграф 117. Антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где

a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным;

c. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2;

d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом, и/или

e. антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с человеческим белком TREM-1 с антигенсвязывающим фрагментом согласно любому из параграфов 81-116.

[0524] Параграф 118. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 117, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое антитело.

[0525] Параграф 119. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область тяжелой цепи антигенсвязывающего белка согласно любому из параграфов 65-118.

[0526] Параграф 120. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область легкой цепи антигенсвязывающего белка согласно любому из параграфов 65-118.

[0527] Параграф 121. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно параграфу 116, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область легкой цепи антигенсвязывающего белка согласно любому из параграфов 65-118.

[0528] Параграф 122. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 119-121, функционально связанный с последовательностью для контроля экспрессии.

[0529] Параграф 123. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 119-121 или вектор согласно параграфу 122.

[0530] Параграф 124. Клетка-хозяин согласно параграфу 123, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

[0531] Параграф 125. Клетка-хозяин согласно параграфу 123 или 124, где клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

[0532] Параграф 126. Способ применения клетки-хозяина согласно любому из параграфов 123-125 для получения антигенсвязывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение указанного антитела.

[0533] Параграф 127. Антигенсвязывающий белок, полученный способом согласно параграфу 126.

[0534] Параграф 128. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-118 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0535] Параграф 129. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение мутеина IL-10 согласно любому из параграфов 1-15 или композиции согласно параграфу 23.

[0536] Параграф 130. Способ согласно параграфу 129, где мутеин IL-10 снижает уровень подавления выработки TNF- α в миелоидных клетках, снижает уровни стимуляции CD8+ Т-клеток и/или снижает уровень стимуляции В-клеток по сравнению с IL-10 wt.

[0537] Параграф 131. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53 или композиции согласно параграфу 64.

[0538] Параграф 132. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение антигенсвязывающего белка согласно любому из параграфов 65-118 или композиции согласно параграфу 128.

[0539] Параграф 133. Способ согласно любому из параграфов 129-132, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита и синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

[0540] Параграф 134. Способ согласно параграфу 133, где воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

[0541] Параграф 135. Способ согласно любому из параграфов 132-134, где антигенсвязывающий белок подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках.

[0542] Параграф 136. Способ согласно любому из параграфов 132-135, где антигенсвязывающий белок подавляет выработку TNF- α в миелоидных клетках, однако по-прежнему не характеризуется активацией CD8+ Т-клеток и В-клеток.

[0543] Параграф 137. Способ согласно любому из параграфов 129-136, где средство для лечения вводят внутривенно или подкожно.

[0544] Параграф 138. Способ согласно любому из параграфов 129-137, где средство для лечения вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в шесть месяцев.

[0545] Параграф 139. Способ согласно любому из параграфов 129-137, дополнительно включающий введение одного или двух дополнительных терапевтических средств.

[0546] Параграф 140. Способ согласно параграфу 139, где дополнительные терапевтические средства выбраны из кортикостероидов, NSAID, анальгетиков, иммуносупрессорных средств, противовоспалительных средств, ингибиторов TNF α , ингибиторов IL-12/IL-23, IL-17 и IFN- γ .

[0547] Параграф 141. Композиция, содержащая мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-15, для применения в лечении воспалительного заболевания.

[0548] Параграф 142. Применение композиции, содержащей мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-15, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0549] Параграф 143. Композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53, для применения в лечении воспалительного заболевания.

[0550] Параграф 144. Применение композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0551] Параграф 145. Композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53 в комбинации с мутеином IL-10 согласно любому из параграфов 1-15, для применения в лечении воспалительного заболевания.

[0552] Параграф 146. Применение композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53 в комбинации с мутеином IL-10 согласно любому из параграфов 1-15, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0553] Параграф 147. Композиция, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-118, для применения в лечении воспалительного заболевания.

[0554] Параграф 148. Применение композиции, содержащей антигенсвязывающий белок согласно любому из параграфов 65-118, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[0555] Параграф 149. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а. антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, и
- б. мутеин IL-10 согласно любому из параграфов 1-15.

[0556] Параграф 150. Фармацевтическая композиция согласно параграфу 140, дополнительно содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, согласно любому из параграфов 24-53.

[0557] Параграф 151. Применение согласно любому из параграфов 142, 144, 146 или 148, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита и синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

[0558] Параграф 152. Композиция для применения согласно любому из параграфов 141, 143, 145 или 147, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита и синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

[0559] Параграф 153. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

- a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;
- b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;
- c. содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий
 - i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1ASQSX_2X_3X_4NLA$ (SEQ ID NO: 2199), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой V или I, где X_3 представляет собой N или S, и где X_4 представляет собой S, H, I, V или A;
 - ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GAX_1X_2RAT (SEQ ID NO: 2200), где X_1 представляет собой S или Y, и где X_2 представляет собой T или I; и
 - iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $QX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7T$ (SEQ ID NO: 2201); где X_1 представляет собой Q, H или E, где X_2 представляет собой F или Y, где X_3 представляет собой K, Y или I, где X_4 представляет собой N, T, L, I или M; где X_5 представляет собой W, F, H или Y, где X_6 отсутствует или представляет собой P; где X_7 представляет собой W, N, Y, H или L; и
- d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий
 - i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3MX_4$ (SEQ ID NO: 2202), где X_1 представляет собой A, R, T или S, где X_2 представляет собой Y или N, где X_3 представляет собой A или W, и где X_4 представляет собой S или N;
 - ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YYX_{10}X_{11}X_{12}VKG$ (SEQ ID NO: 2205), где X_1 представляет собой T, E или S, где X_2 отсутствует или представляет собой M, V или I, где X_3 представляет собой S, R или K, где X_4 представляет собой G или Q, где X_5 представляет собой S, D или H, где

X₆ представляет собой G, S, L или A, где X₇ представляет собой S, G или R, где X₈ представляет собой T, S, P или E, где X₉ представляет собой T или I, где X₁₀ представляет собой A или V, где X₁₁ представляет собой D или E, и где X₁₂ представляет собой S или A; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇FX₈YYX₉ (SEQ ID NO: 2203), где X₁ представляет собой V, E, A или G, где X₂ представляет собой A, F, Y или G, где X₃ представляет собой G, S, Y или W, где X₄ представляет собой S или R, где X₅ отсутствует или представляет собой N, где X₆ представляет собой F, S, Y или отсутствует, где X₇ представляет собой L или F или отсутствует, где X₈ представляет собой D или E, и где X₉ представляет собой Y, H или S.

[0560] Параграф 154. Выделенный антигенсвязывающий белок согласно параграфу 153, где антигенсвязывающий белок содержит

a. варибельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 2212);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 2219);

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QQFKNWPPT (SEQ ID NO: 2222); и

b. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AYAMS (SEQ ID NO: 2227);

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность TSGSGSTTYADSVKG (SEQ ID NO: 2230); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VAGSNFLFDY (SEQ ID NO: 2670).

[0561] Параграф 155. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

c. содержит варибельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASX₁DIX₂X₃X₄LN (SEQ ID NO: 2204), где X₁ представляет собой R или Q, где X₂ представляет собой R, S, N или F, где X₃ представляет собой K или N, и где X₄ представляет собой H, Y или D;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄LET (SEQ ID NO: 2206), где X₁ представляет собой D, G или H, где X₂ представляет собой A, V или T, где X₃ представляет собой S, A или Y, и где X₄ представляет собой T или N;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QX₁YX₃X₄X₅PX₆T (SEQ ID NO: 2207), где X₁ представляет собой Q или H, где X₂ представляет собой D, A или G, где X₃ представляет собой N или K; где X₄ представляет собой L или I, и где X₅ представляет собой I или L; и

d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁YDIN (SEQ ID NO: 2208), где X₁ представляет собой R или S;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂NPX₃X₄GX₅X₆GX₇X₈X₉X₁₀FX₁₁X₁₂ (SEQ ID NO: 2209), где X₁ представляет собой W или R, где X₂ представляет собой M или L, где X₃ представляет собой N, Q или K, где X₄ представляет собой S, A или R, где X₅ представляет собой N или Q, где X₆ представляет собой S, A или T, где X₇ представляет собой S, Q или Y, где X₈ представляет собой V или T, где X₉ представляет собой Q или K, где X₁₀ представляет собой K или N, где X₁₁ представляет собой R или Q, и где X₁₂ представляет собой G или D; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂FX₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 2210); где X₁ представляет собой G, L или R, где X₂ представляет собой G, I или R, где X₃ представляет собой Y, R, I, G или A, где X₄ представляет собой T, S, Y или V, где X₅ представляет собой S или Y, где X₆ представляет собой S, A, I или R, где X₇ представляет собой W, A или S, где X₈ отсутствует или представляет собой S, где X₉ отсутствует или представляет собой F, W или Y, и где X₁₀ представляет собой R, S, H, K или E, где X₁₁ представляет собой W, H, Y или F, где X₁₂ представляет собой Y, V, A или S, где X₁₃ представляет собой D или Q, и где X₁₄ представляет собой L, Y, I или H.

[0562] Параграф 156. Антигенсвязывающий белок согласно параграфу 155, где антигенсвязывающий белок содержит

a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASQDIRKHLN (SEQ ID NO: 2213);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DASNLET (SEQ ID NO: 2220); и

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYDNLPIIT (SEQ ID NO: 2223); и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RYDIN (SEQ ID NO: 2228);

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность WMNPNSGNSSVQKFRG (SEQ ID NO: 2231); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GGYTSSWRWYFDL (SEQ ID NO: 2671) или GGYTSSWSRWYFDL (SEQ ID NO: 2672).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутеин человеческого интерлейкина-10 (IL-10), содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, где указанный мутеин IL-10 предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей AB, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали A, спирали B, спирали C, спирали D, спирали E и/или спирали F.

2. Мутеин IL-10 по п. 2, где мутация представляет собой одну или несколько из R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N или N160D в SEQ ID NO: 2, необязательно содержащий добавление 6 аминокислот между спиралью D и спиралью E.

3. Мутеин IL-10 по п. 1 или п. 2, где мутеин IL-10 имеет аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 3-10 или SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540 или 2777-2791.

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует мутеин IL-10 по любому из пп. 1-3.

5. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

c. содержит переменный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2191;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

d. содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

6. Антигенсвязывающий белок по п. 5, где антигенсвязывающий белок содержит набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); или

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

7. Антигенсвязывающий белок по п. 5 или п. 6, содержащий

а. варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185; или

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

б. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186; или

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

8. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-7, где антигенсвязывающий белок содержит

i) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 41, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 42;

xii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 261, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 262;

xiii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 281, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 282;

xiv) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 301, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 302; или

xv) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 2185, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 2186.

9. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь по любому из пп. 5-8, тяжелую цепь по любому из пп. 5-8 или обе.

10. Антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где

a. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела,

b. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным,

c. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутантов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2, и

d. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом.

11. Антигенсвязывающий белок, содержащий

(a) полипептидную последовательность, имеющую формулу A-L-M или M-L-A, где

i) A представляет собой тяжелую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,

ii) L представляет собой линкерный пептид, содержащий от 4 до 20 аминокислот, и

iii) M представляет собой мутант IL-10, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с IL-10 wt, изложенным под SEQ ID NO: 2, и

(b) легкую цепь иммуноглобулина из антитела IgG, которое связывается с белком TREM-1, изложенным под SEQ ID NO: 20,

где тяжелая цепь иммуноглобулина из (a) и легкая цепь иммуноглобулина из (b) образуют фрагмент антитела IgG, который связывает TREM-1, где белок содержит одну

или две молекулы полипептида из (а) и одну или две молекулы легкой цепи из (b), где необязательно только 1 полипептид из (а) содержит фрагмент М.

12. Антигенсвязывающий белок по п. 10 или п. 11, где

а. каждый фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, и

б. каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает по меньшей мере одну мутацию, выбранную из мутации в петле спиралей АВ, петле спиралей CD, петле спиралей DE, спирали А, спирали В, спирали С, спирали D, спирали Е и/или спирали F.

13. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-12, где каждый фрагмент IL-10 независимо предусматривает

i) мутацию в одном или нескольких из остатков N10, H14, F15, P20, M22, L23, R24, R27, D28, K34, T35, Q38, M39, K40, D41, Q42, L43, D44, N45, L46, L47, L48, K49, F56, K57, Y59, L60, Q63, E67, Q70, M77, Q79, N82, Q83, D84, P85, D86, I87, A89, H90, S93, T100, L103, H109, R110, L112, E115, N116, A127, K130, I136, Y137, K138, S141, E142, D144, I145, E151, M154, M156, K157 или N160 в SEQ ID NO: 2, или добавление 4-8 аминокислот между спиралью D и спиралью E; и/или

ii) одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из N10Q, N10I, N10K, R27L, K34D, D41G, L46K, Q38E, Q38R, Q38D, K138L, K138D, I87A, H14Q, F15Y, M22V, K49T, K49S, F56Y, K57N, Y59T, L60Q, Q63E, Q63L, E67C, Q70E, Q70K, M77R, M77V, Q79R, Q79C, D84R, A89P, H90E, H90Q, S93E, S93Q, T100R, L103E, H109D, R110P, R110Q, L112V, E115K, N116D, N110Q, A127M, K130Q, I136C, Y137C, M154V, M156C, K157N, или N160D в SEQ ID NO: 2, при этом он необязательно предусматривает добавление шести аминокислот между спиралью D и спиралью E.

14. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-13, где фрагмент IL-10 имеет аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 3-10 или SEQ ID NO: 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540 или 2777-2791.

15. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009,

1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085.

16. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-15, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

17. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-16, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

18. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007.

19. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или п. 18, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570,

2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605.

20. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или пп. 18-19, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1883, 1885, 1887, 1889, 1891, 1893, 1895, 1897, 1899, 1901, 1903, 1905, 1907, 1909, 1911, 1913, 1915, 1917, 1919, 1921, 1923, 1925, 1927, 1929, 1931, 1933, 1935, 1937, 1939, 1941, 1943, 1945, 1947, 1949, 1951, 1953, 1955, 1957, 1959, 1961, 1963, 1965, 1967, 1969, 1971, 1973, 1975, 1977, 1979, 1981, 1983, 1985, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995, 1997, 1999, 2001, 2003, 2005, и 2007, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605.

21. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135.

22. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или п. 21, который содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307, 2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

23. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или пп. 21-22, который содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021, 2026, 2025, 2027, 2029, 2031, 2033, 2035, 2037, 2039, 2041, 2043, 2045, 2047, 2049, 2051, 2053, 2055, 2057, 2059, 2061, 2063, 2065, 2067, 2069, 2071, 2073, 2075, 2077, 2079, 2081, 2083, 2085, 2087, 2089, 2091, 2093, 2095, 2097, 2099, 2101, 2103, 2105, 2107, 2109, 2111, 2113, 2115, 2117, 2119, 2121, 2123, 2125, 2127, 2129, 2131, 2133, и 2135, и соответствующую аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 2233, 2235, 2237, 2239, 2241, 2243, 2245, 2247, 2249, 2251, 2253, 2255, 2257, 2259, 2261, 2263, 2265, 2267, 2269, 2271, 2273, 2275, 2277, 2279, 2281, 2283, 2285, 2287, 2289, 2291, 2293, 2295, 2297, 2299, 2301, 2303, 2305, 2307,

2309, 2311, 2313, 2315, 2317, 2319, 2321, 2323, 2325, 2327, 2329, 2331, 2333, 2335, 2337, 2339, 2341, 2343, 2345, 2347, 2349, 2351, 2353, 2355, и 2357.

24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-23, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержащий

а. варибельный домен легкой цепи, содержащий

i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210, 230, 250, 270, 290 и 2190;

ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 51, 71, 91, 111, 131, 151, 171, 191, 211, 231, 251, 271, 291 и 2190;

iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 192, 212, 232, 252, 272, 292 и 2192; и

б. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 176, 196, 216, 236, 256, 276, 296 и 2196;

ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 37, 57, 77, 97, 117, 137, 157, 177, 197, 217, 237, 257, 277, 297 и 2197; и

iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38, 58, 78, 98, 118, 138, 158, 178, 198, 218, 238, 258, 278, 298 и 2198.

25. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-24, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержащий набор аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из

i) SEQ ID NO: 30 (LCDR1), SEQ ID NO: 31 (LCDR2), SEQ ID NO: 32 (LCDR3), SEQ ID NO: 36 (HCDR1), SEQ ID NO: 37 (HCDR2) и SEQ ID NO: 38 (HCDR3);

ii) SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), SEQ ID NO: 52 (LCDR3), SEQ ID NO: 56 (HCDR1), SEQ ID NO: 57 (HCDR2) и SEQ ID NO: 58 (HCDR3);

iii) SEQ ID NO: 70 (LCDR1), SEQ ID NO: 71 (LCDR2), SEQ ID NO: 72 (LCDR3), SEQ ID NO: 76 (HCDR1), SEQ ID NO: 77 (HCDR2) и SEQ ID NO: 78 (HCDR3);

iv) SEQ ID NO: 90 (LCDR1), SEQ ID NO: 91 (LCDR2), SEQ ID NO: 92 (LCDR3), SEQ ID NO: 96 (HCDR1), SEQ ID NO: 97 (HCDR2) и SEQ ID NO: 98 (HCDR3);

v) SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), SEQ ID NO: 112 (LCDR3), SEQ ID NO: 116 (HCDR1), SEQ ID NO: 117 (HCDR2) и SEQ ID NO: 118 (HCDR3);

vi) SEQ ID NO: 130 (LCDR1), SEQ ID NO: 131 (LCDR2), SEQ ID NO: 132 (LCDR3), SEQ ID NO: 136 (HCDR1), SEQ ID NO: 137 (HCDR2) и SEQ ID NO: 138 (HCDR3);

vii) SEQ ID NO: 150 (LCDR1), SEQ ID NO: 151 (LCDR2), SEQ ID NO: 152 (LCDR3), SEQ ID NO: 156 (HCDR1), SEQ ID NO: 157 (HCDR2) и SEQ ID NO: 158 (HCDR3);

viii) SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), SEQ ID NO: 172 (LCDR3), SEQ ID NO: 176 (HCDR1), SEQ ID NO: 177 (HCDR2) и SEQ ID NO: 178 (HCDR3);

ix) SEQ ID NO: 190 (LCDR1), SEQ ID NO: 191 (LCDR2), SEQ ID NO: 192 (LCDR3), SEQ ID NO: 196 (HCDR1), SEQ ID NO: 197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 198 (HCDR3);

x) SEQ ID NO: 210 (LCDR1), SEQ ID NO: 211 (LCDR2), SEQ ID NO: 212 (LCDR3), SEQ ID NO: 216 (HCDR1), SEQ ID NO: 217 (HCDR2) и SEQ ID NO: 218 (HCDR3);

xi) SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), SEQ ID NO: 232 (LCDR3), SEQ ID NO: 236 (HCDR1), SEQ ID NO: 237 (HCDR2) и SEQ ID NO: 238 (HCDR3);

xii) SEQ ID NO: 250 (LCDR1), SEQ ID NO: 251 (LCDR2), SEQ ID NO: 252 (LCDR3), SEQ ID NO: 256 (HCDR1), SEQ ID NO: 257 (HCDR2) и SEQ ID NO: 258 (HCDR3);

xiii) SEQ ID NO: 270 (LCDR1), SEQ ID NO: 271 (LCDR2), SEQ ID NO: 272 (LCDR3), SEQ ID NO: 276 (HCDR1), SEQ ID NO: 277 (HCDR2) и SEQ ID NO: 278 (HCDR3);

xiv) SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), SEQ ID NO: 292 (LCDR3), SEQ ID NO: 296 (HCDR1), SEQ ID NO: 297 (HCDR2) и SEQ ID NO: 298 (HCDR3); или

xv) SEQ ID NO: 2190 (LCDR1), SEQ ID NO: 2191 (LCDR2), SEQ ID NO: 2192 (LCDR3), SEQ ID NO: 2196 (HCDR1), SEQ ID NO: 2197 (HCDR2) и SEQ ID NO: 2198 (HCDR3).

26. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-25, где антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержит

а. варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, на по меньшей мере 80% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 41, 61, 81, 101, 121, 141, 161, 181, 201, 221, 241, 261, 281, 301 и 2185;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 39, 59, 79, 99, 119, 139, 159, 179, 199, 219, 239, 259, 279, 299 и 2183; и

б. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. последовательности, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

ii. последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 182, 202, 222, 242, 262, 282, 302 и 2186;

iii. последовательности, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 и 2184.

27. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-26, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, связывающий TREM-1, содержащий

i) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 41, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 42;

ii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 61, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 62;

iii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 81, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 82;

iv) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 101, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 102;

v) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 121, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 122;

vi) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 141, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 142;

vii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную переменному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 161, и

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 162;

viii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 181, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 182;

ix) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 201, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 202;

x) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 221, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 222;

xi) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 241, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 242;

xii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 261, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 262;

xiii) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 281, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 282;

xiv) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 301, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 302; или

xv) аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену легкой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 2185, и аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную варибельному домену тяжелой цепи, изложенному под SEQ ID NO: 2186.

28. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 24-27, где

a. антигенсвязывающий белок содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи;

b. каждая тяжелая цепь содержит фрагмент IL-10, присоединенный на С-конце тяжелой цепи;

c. каждый антигенсвязывающий белок на основе тяжелой цепи-фрагмента IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную

последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 863, 865, 867, 869, 871, 873, 875, 877, 879, 881, 883, 885, 887, 889, 891, 893, 895, 897, 899, 901, 903, 905, 907, 909, 911, 913, 915, 917, 919, 921, 923, 925, 927, 929, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1007, 1009, 1011, 1013, 1015, 1017, 1019, 1021, 1023, 1025, 1027, 1029, 1031, 1033, 1035, 1037, 1039, 1041, 1043, 1045, 1047, 1049, 1051, 1053, 1055, 1057, 1059, 1061, 1063, 1065, 1067, 1069, 1071, 1073, 1075, 1077, 1079, 1081, 1083, и 1085; и

d. каждое легкая цепь-фрагмент IL-10 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, и 1086.

29. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или пп. 24-27, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелая цепь-фрагмент IL-10, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2137, 2139, 2141, 2143, 2145, 2147, 2149, 2151, 2153, 2155, 2157, 2159, 2161, 2163, 2165, 2167, 2169, 2171, 2173, 2175, 2177, 2179, 2181, 2359, 2361, 2363, 2365, 2367, 2369, 2371, 2373, 2375, 2377, 2379, 2381, 2383, 2385, 2387, 2389, 2391, 2393, 2395, 2397, 2399, 2401, 2403, 2405, 2407, 2409, 2411, 2143, 2415, 2417, 2419, 2421, 2423, 2425, 2427, 2429, 2431, 2433, 2435, 2437, 2439, 2441, 2443, 2445, 2447, 2449, 2451, 2453, 2455, 2457, 2459, 2461, 2463, 2465, 2467, 2469, 2471, 2473, 2475, 2477, 2479, 2481, 2483, 2485, 2487, 2489, 2491, 2493, 2495, 2497, 2498, 2499, 2501, 2503, 2505, 2507, 2509, 2511, 2513, 2515, 2517, 2519, 2521, 2523, 2525, 2527, 2529, 2531, 2533, 2535, 2537, 2539 и 2726-2776.

30. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-14 или пп. 24-28, где антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелая цепь-фрагмент IL-10, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2727-2732.

31. Антигенсвязывающий белок по п. 30, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2727 или 2728 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 976 или SEQ ID NO: 2554.

32. Антигенсвязывающий белок по п. 30, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2729, 2730, 2731 или 2732 и аминокислотную последовательность легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 992 или SEQ ID NO: 2555.

33. Антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент и один или два фрагмента IL-10, где

а. антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или фрагмент антитела;

б. каждый фрагмент IL-10 независимо является моновалентным или бивалентным;

с. каждый фрагмент IL-10 независимо выбран из одного или нескольких мутеинов человеческого IL-10, имеющих последовательности, которые на 90% идентичны SEQ ID NO: 2;

д. по меньшей мере один фрагмент IL-10 ковалентно связан с антигенсвязывающим фрагментом, и/или

е. антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с человеческим белком TREM-1 с антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 24-27.

34. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует область тяжелой цепи антигенсвязывающего белка по любому из пп. 10-33, область легкой цепи антигенсвязывающего белка по любому из пп. 10-33 или обе.

35. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

i) мутеина IL-10 по любому из пп. 1-3;

ii) антигенсвязывающего белка, связывающего TREM-1, по любому из пп. 5-8 или

iii) антигенсвязывающего белка по любому из пп. 10-33.

36. Способ по п. 35, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, болезни Крона, синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита и синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

37. Композиция для применения в лечении воспалительного заболевания, содержащая

i) мутеин IL-10 по любому из пп. 1-3;

ii) антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, по любому из пп. 5-8 или

iii) антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-33.

38. Применение композиции, содержащей мутеин IL-10 по любому из пп. 1-3, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

39. Применение композиции в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания, при этом композиция содержит

i) мутеин IL-10 по любому из пп. 1-3;

ii) антигенсвязывающий белок, связывающий TREM-1, по любому из пп. 5-8 или

iii) антигенсвязывающий белок по любому из пп. 10-33.

40. Применение композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, связывающие TREM-1, по любому из пп. 5-8 и пп. 10-33 в комбинации с мутеином IL-10 по любому из пп. 1-3 в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

41. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

- a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;
 - b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;
 - c. содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий
 - i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1ASQSX_2X_3X_4NLA$ (SEQ ID NO: 2199), где X_1 представляет собой R или Q, где X_2 представляет собой V или I, где X_3 представляет собой N или S, и где X_4 представляет собой S, H, I, V или A;
 - ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GAX_1X_2RAT (SEQ ID NO: 2200), где X_1 представляет собой S или Y, и где X_2 представляет собой T или I; и
 - iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $QX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7T$ (SEQ ID NO: 2201); где X_1 представляет собой Q, H или E, где X_2 представляет собой F или Y, где X_3 представляет собой K, Y или I, где X_4 представляет собой N, T, L, I или M; где X_5 представляет собой W, F, H или Y, где X_6 отсутствует или представляет собой P; где X_7 представляет собой W, N, Y, H или L; и
 - d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий
 - i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3MX_4$ (SEQ ID NO: 2202), где X_1 представляет собой A, R, T или S, где X_2 представляет собой Y или N, где X_3 представляет собой A или W, и где X_4 представляет собой S или N;
 - ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YYX_{10}X_{11}X_{12}VKG$ (SEQ ID NO: 2205), где X_1 представляет собой T, E или S, где X_2 отсутствует или представляет собой M, V или I, где X_3 представляет собой S, R или K, где X_4 представляет собой G или Q, где X_5 представляет собой S, D или H, где X_6 представляет собой G, S, L или A, где X_7 представляет собой S, G или R, где X_8 представляет собой T, S, P или E, где X_9 представляет собой T или I, где X_{10} представляет собой A или V, где X_{11} представляет собой D или E, и где X_{12} представляет собой S или A; и
 - iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7FX_8YYX_9$ (SEQ ID NO: 2203), где X_1 представляет собой V, E, A или G, где X_2 представляет собой A, F, Y или G, где X_3 представляет собой G, S, Y или W, где X_4 представляет собой S или R, где X_5 отсутствует или представляет собой N, где X_6 представляет собой F, S, Y или отсутствует, где X_7 представляет собой L или F или отсутствует, где X_8 представляет собой D или E, и где X_9 представляет собой Y, H или S.
42. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 41, где антигенсвязывающий белок содержит
- a. вариабельный домен легкой цепи, содержащий
 - i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность $RASQSVNSNLA$ (SEQ ID NO: 2212);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 2219);

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QQFKNWPPT (SEQ ID NO: 2222); и

b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность AYAMS (SEQ ID NO: 2227);

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность TSGSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2230); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VAGSNFLFDY (SEQ ID NO: 2670).

43. Выделенный антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок

a. представляет собой антитело или фрагмент антитела;

b. связывается с человеческим TREM-1, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20;

c. содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASX₁DIX₂X₃X₄LN (SEQ ID NO: 2204), где X₁ представляет собой R или Q, где X₂ представляет собой R, S, N или F, где X₃ представляет собой K или N, и где X₄ представляет собой H, Y или D;

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄LET (SEQ ID NO: 2206), где X₁ представляет собой D, G или H, где X₂ представляет собой A, V или T, где X₃ представляет собой S, A или Y, и где X₄ представляет собой T или N;

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QX₁YX₃X₄X₅PX₆T (SEQ ID NO: 2207), где X₁ представляет собой Q или H, где X₂ представляет собой D, A или G, где X₃ представляет собой N или K; где X₄ представляет собой L или I, и где X₅ представляет собой I или L; и

d. содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁YDIN (SEQ ID NO: 2208), где X₁ представляет собой R или S;

ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂NPX₃X₄GX₅X₆GX₇X₈X₉X₁₀FX₁₁X₁₂ (SEQ ID NO: 2209), где X₁ представляет собой W или R, где X₂ представляет собой M или L, где X₃ представляет собой N, Q или K, где X₄ представляет собой S, A или R, где X₅ представляет собой N или Q, где X₆ представляет собой S, A или T, где X₇ представляет собой S, Q или Y, где X₈ представляет собой V или T, где X₉ представляет собой Q или K, где X₁₀ представляет собой K или N, где X₁₁ представляет собой R или Q, и где X₁₂ представляет собой G или D; и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂FX₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 2210); где X₁ представляет собой G,

L или R, где X_2 представляет собой G, I или R, где X_3 представляет собой Y, R, I, G или A, где X_4 представляет собой T, S, Y или V, где X_5 представляет собой S или Y, где X_6 представляет собой S, A, I или R, где X_7 представляет собой W, A или S, где X_8 отсутствует или представляет собой S, где X_9 отсутствует или представляет собой F, W или Y, и где X_{10} представляет собой R, S, H, K или E, где X_{11} представляет собой W, H, Y или F, где X_{12} представляет собой Y, V, A или S, где X_{13} представляет собой D или Q, и где X_{14} представляет собой L, Y, I или H.

44. Антигенсвязывающий белок по п. 43, где антигенсвязывающий белок содержит
а. варибельный домен легкой цепи, содержащий

i. CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QASQDIRKHLN (SEQ ID NO: 2213);

ii. CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DASNLET (SEQ ID NO: 2220); и

iii. CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QHYDNLPIIT (SEQ ID NO: 2223); и

б. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий

i. CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RYDIN (SEQ ID NO: 2228);

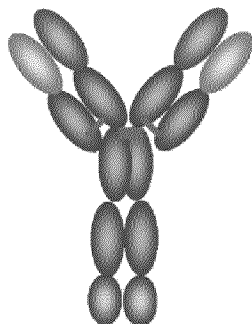
ii. CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность WMNPNSGNSSVQKFRG (SEQ ID NO: 2231); и

iii. CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GGYTSSWRWYFDL (SEQ ID NO: 2671) или GGYTSSWSRWYFDL (SEQ ID NO: 2672).

По доверенности

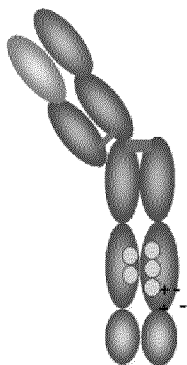
1/12

Фигура 1А



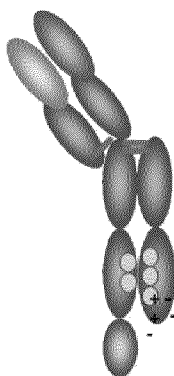
TREM-1/мутеин IL-10

Фигура 1В



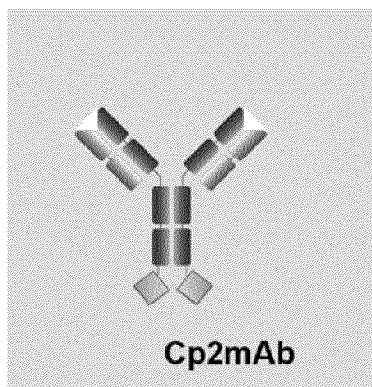
TREM-1, моно/мутеин IL-10

Фигура 1С

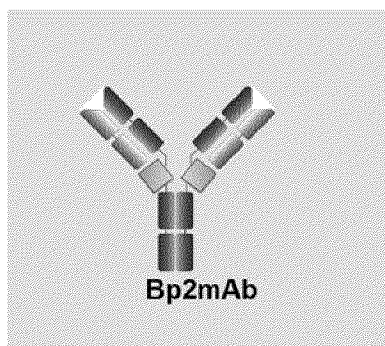


Антитело к TREM-1, моно/мутеин IL-10, моно

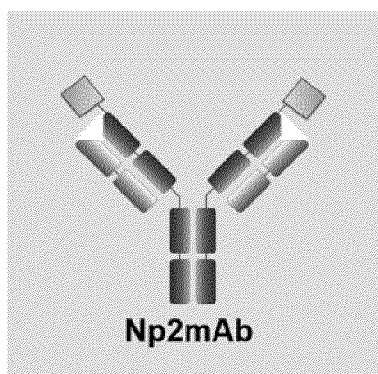
Фигура 1D



С-конец

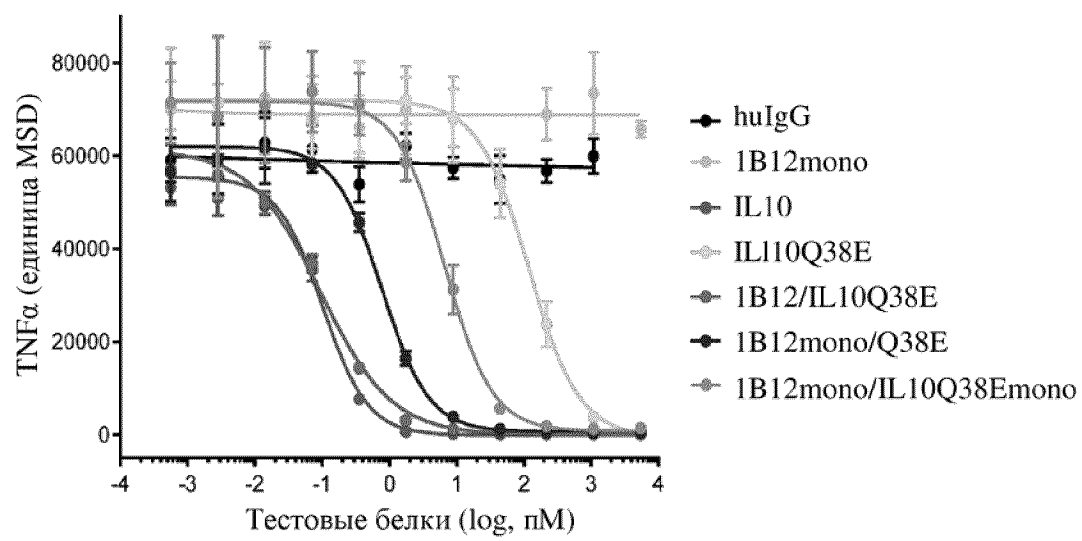


Погруженный-Fab-G4-IL-10 G4-Fc

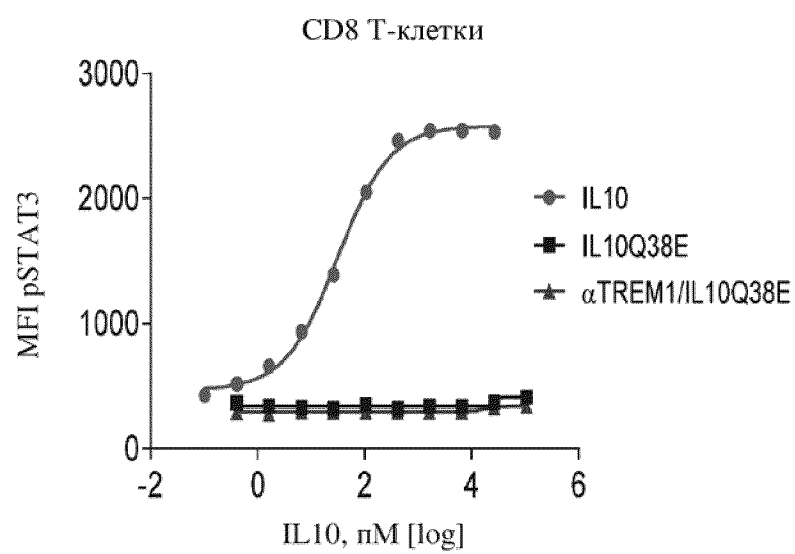


N-конец

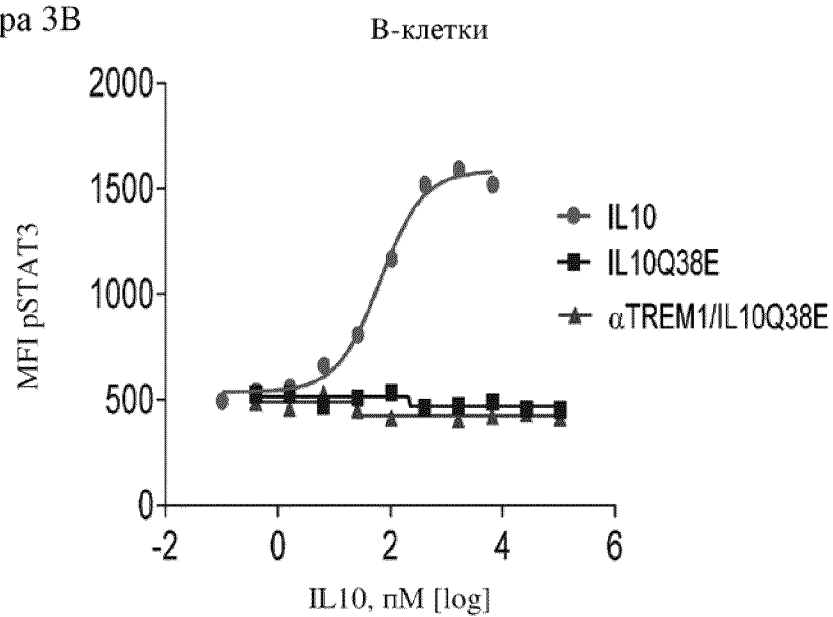
Фигура 2



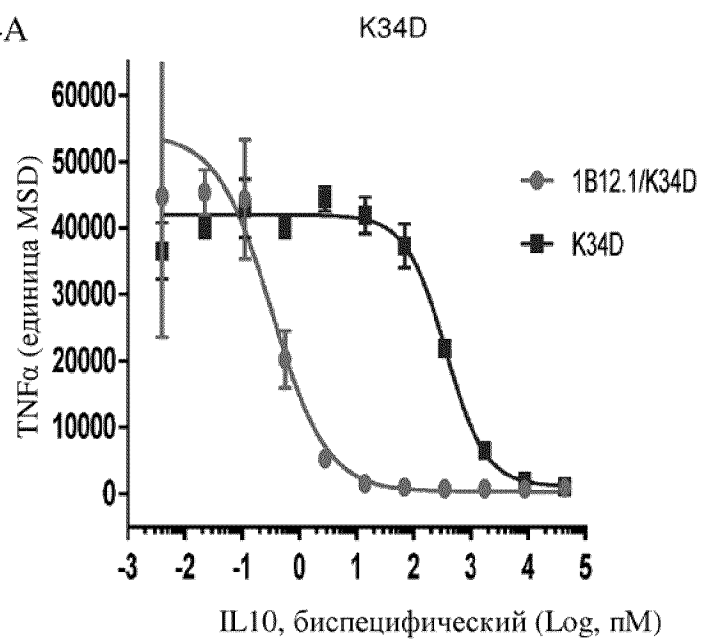
Фигура 3А



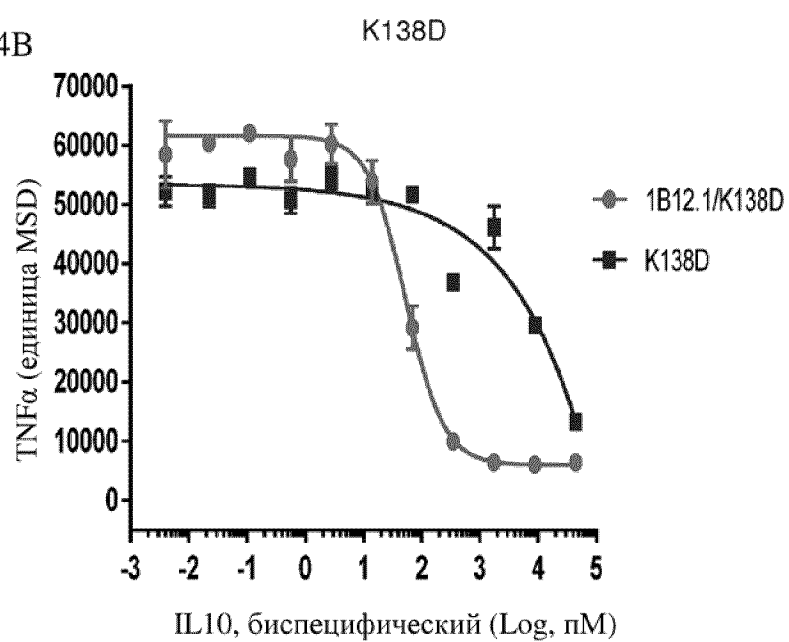
Фигура 3В



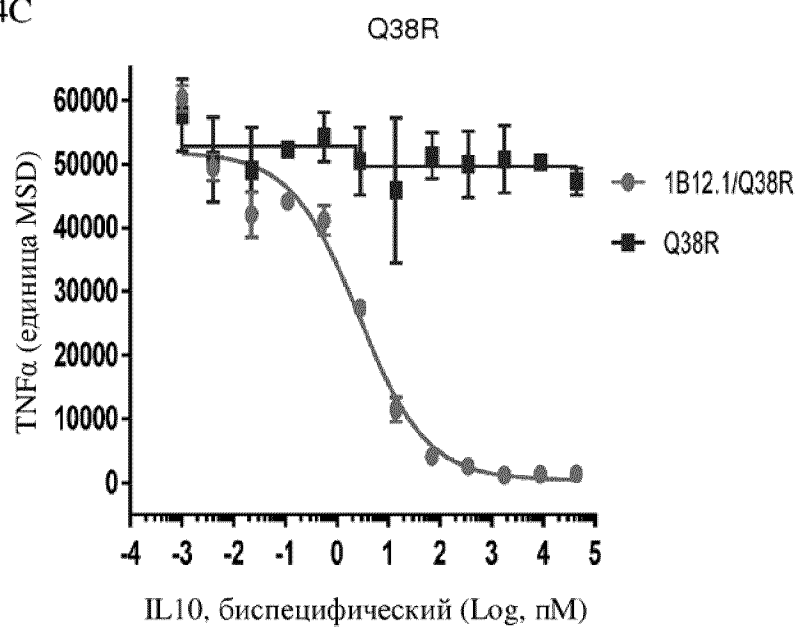
Фигура 4А



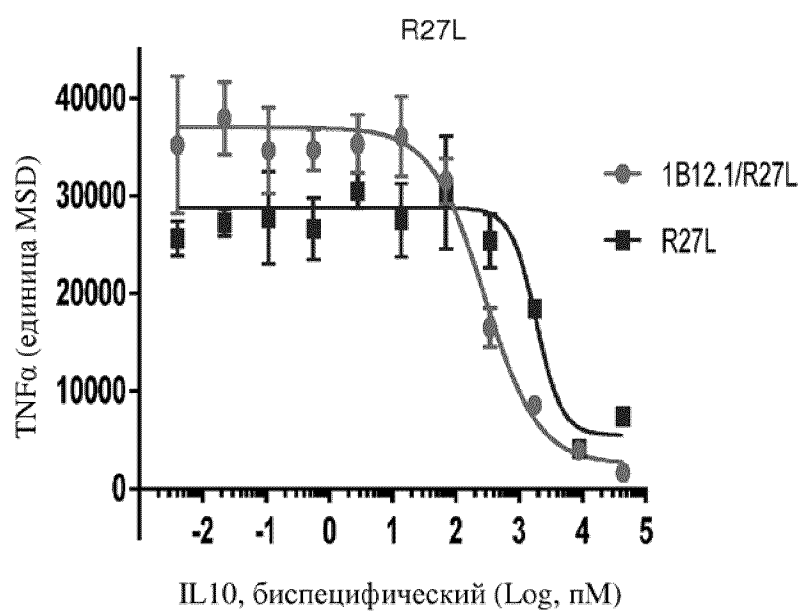
Фигура 4В



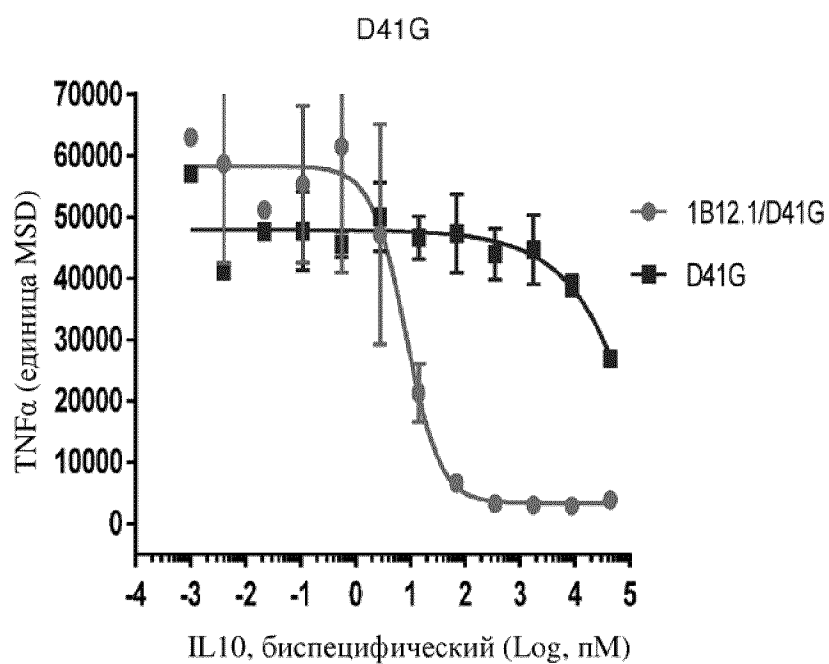
Фигура 4С



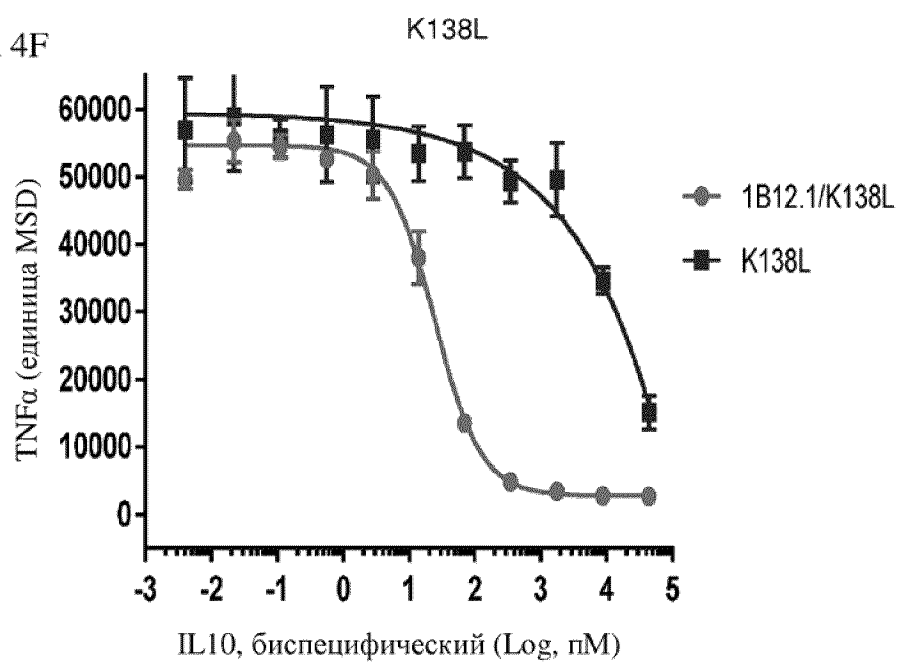
Фигура 4D



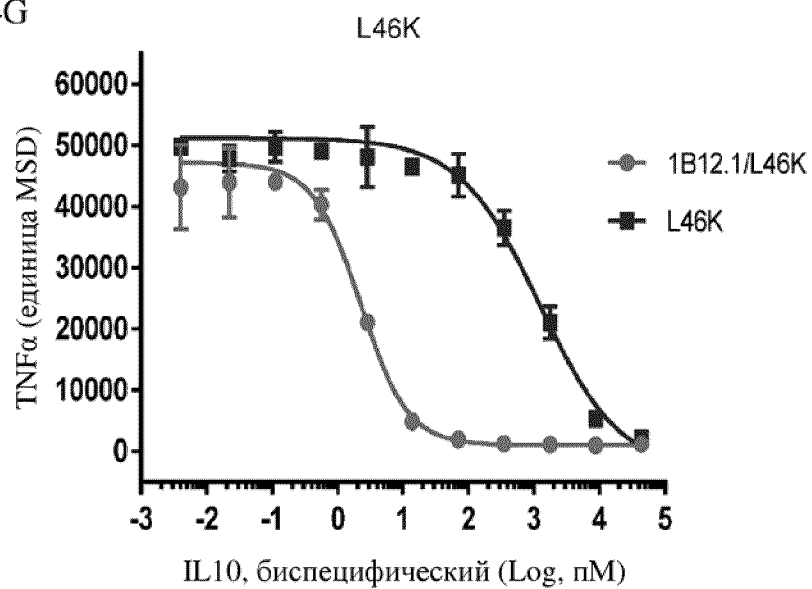
Фигура 4Е



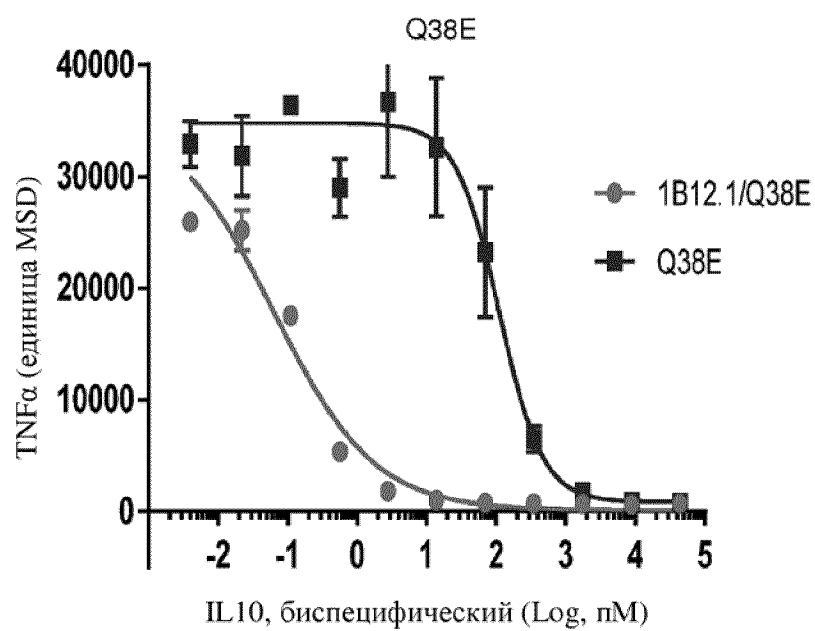
Фигура 4F



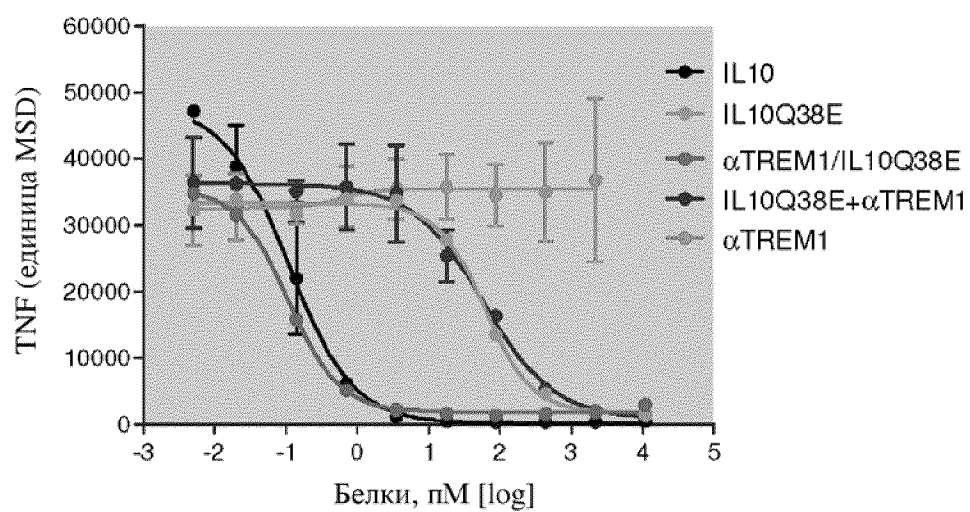
Фигура 4G



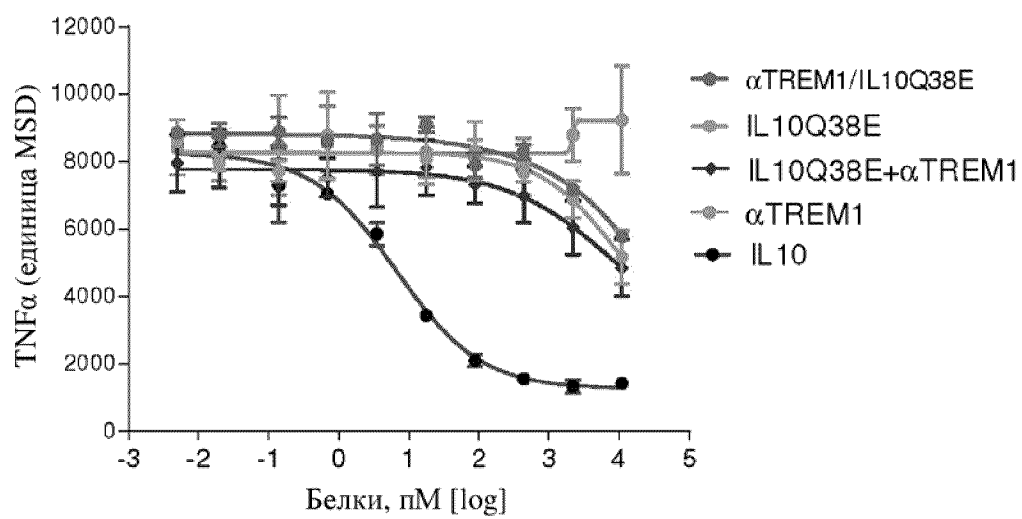
Фигура 4H



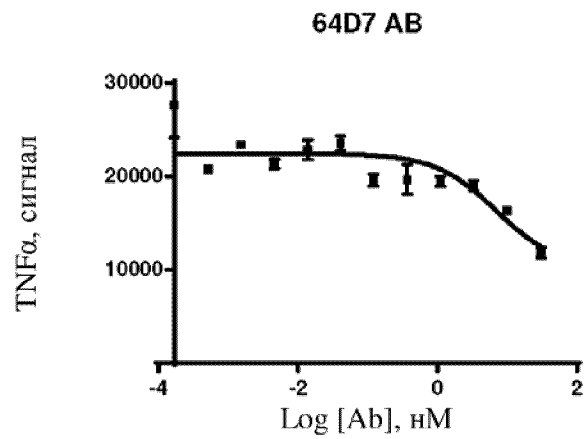
Фигура 5А. Моноциты человека



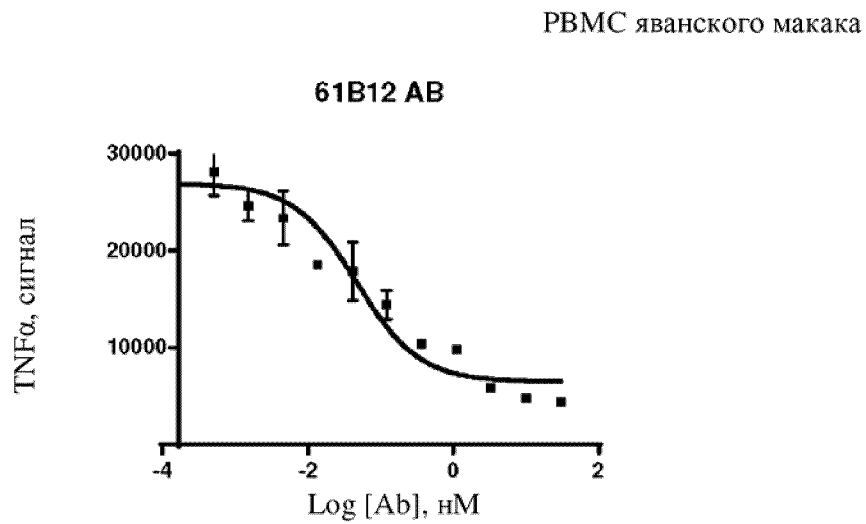
Фигура 5В. Моноциты мыши



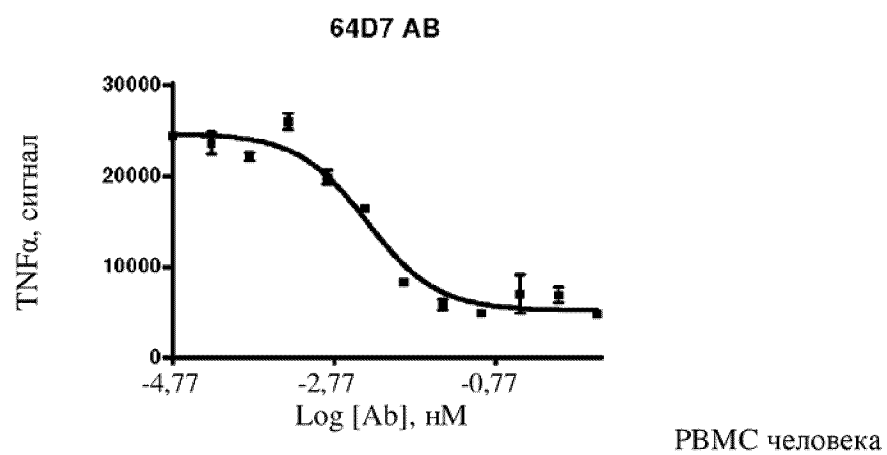
Фигура 6А



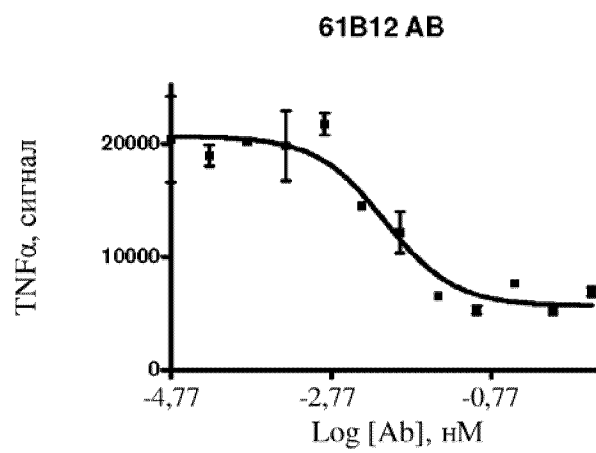
Фигура 6В



Фигура 6С



Фигура 6D



Фигура 7

