



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113214397 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(21) 申请号 202110365573.4

(22) 申请日 2015.07.17

(30) 优先权数据

14177547.8 2014.07.17 EP

14194893.5 2014.11.26 EP

(62) 分案原申请数据

201580038005.6 2015.07.17

(71) 申请人 诺和诺德股份有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 A. 亨里克森 K. 克耶加德

V. 韦斯特法尔斯滕尼克 C. 维贝里

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 甘霖

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

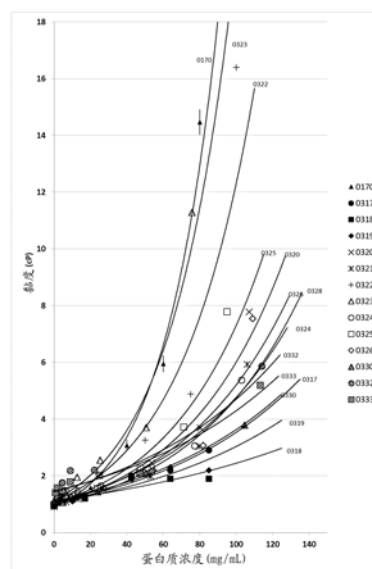
权利要求书2页 说明书27页
序列表22页 附图6页

(54) 发明名称

定点诱变TREM-1抗体以降低黏度

(57) 摘要

描述了能够特异性结合TREM-1并阻止其活化的抗体,其具有良好的亲和力和在临床相关浓度下的低黏度,TREM-1是一种在单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞中表达的蛋白。此类抗体可用于治疗患有炎症性疾病诸如类风湿性关节炎和炎症性肠病的个体。



1. 一种能够结合TREM-1的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段在80 mg/mL的浓度下具有小于5 cP的黏度。

2. 权利要求1所述的抗体或其片段,其包含重链可变区(VH)的CDR1、CDR2和CDR3和轻链可变区(VL)的CDR1、CDR2和CDR3,并且其与包含SEQ ID NO: 2的重链和SEQ ID NO: 3的轻链的抗体结合相同的表位,其中所述抗体或其片段的CDR1和CDR3区中的一个或多个带负电残基不同于SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3中的残基,并且是不带电氨基酸残基。

3. 权利要求1或2所述的抗体或其片段,其包含了含有SEQ ID NO: 2中VH的VH和含有SEQ ID NO: 3中VL的变体的VL,其中SEQ ID NO: 3的氨基酸残基1、27、30、33、74、97和98中的一个或多个是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

4. 权利要求1-3中任一项所述的抗体或其片段,其包含了含有SEQ ID NO: 2中的VH的VH和含有SEQ ID NO: 3中的VL的变体的VL,其中SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基27和氨基酸残基97中的至少一个或两者是不带电氨基酸。

5. 权利要求4所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 3中的VL变体中的氨基酸残基27和氨基酸残基97中的至少一个或两者是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

6. 权利要求1-4中任一项所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基27为谷氨酰胺且SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基97为选自以下的氨基酸:甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸,或其中SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基97为谷氨酰胺且SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基27为选自以下的氨基酸:甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

7. 权利要求1-6中任一项所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基27和97为谷氨酰胺或丝氨酸。

8. 权利要求1-5中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO: 2 中的VH且VL是选自以下的序列中的VL:SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和 SEQ ID NO: 8。

9. 权利要求1所述的抗体或其片段,其包含了含有SEQ ID NO: 2中VH的变体的VH和含有SEQ ID NO: 3中VL的变体的VL,其中SEQ ID NO: 2的VH变体中的氨基酸残基32、52、55、56、57、59、102、104和106 或SEQ ID NO 3的VL变体中的氨基酸残基32、33、34、53、54和98中的任一个是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

10. 权利要求9所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 2的VH变体中的氨基酸残基59和57中的至少一个或氨基酸残基59和57两者是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

11. 权利要求10所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 2的VH变体中的氨基酸残基59和57中的至少一个或氨基酸残基59和57两者是丝氨酸或酪氨酸。

12. 权利要求10所述的抗体或其片段,其包含是选自以下的序列中的VH的VH:SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 13,以及 SEQ ID NO: 3中的VL。

13. 权利要求1所述的抗体或其片段,其包含含有SEQ ID NO: 2中VH的变体的VH,和含

有SEQ ID NO:3中VL的变体的VL,其中:

i) SEQ ID NO:3的CDR1和CDR3区的至少一个带负电残是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸且

ii) SEQ ID NO: 2的VH变体中的氨基酸残基32、52、55、56、57、59、102、104和106或SEQ ID NO 3的VL变体中的氨基酸残基32、33、34、53、54和98中的至少一个是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

14. 权利要求13所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3的至少一个带负电的残基是氨基酸残基27或97。

15. 权利要求14的抗体或其片段,其中:

SEQ ID NO:3的VL变体中的氨基酸残基27和97中的一个或两者是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸;且

SEQ ID NO:2的VH变体中的氨基酸残基59和57中的至少一个或两者是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

16. 权利要求15所述的抗体或其片段,其中SEQ ID NO:3的VL变体中的氨基酸残基27和97中的一个或两者是丝氨酸或谷氨酰胺;且SEQ ID NO:2的VH变体中的氨基酸残基59和57中的一个或两者是丝氨酸或酪氨酸。

17. 权利要求15所述的抗体或其片段,其包含含有SEQ ID NO:2中VH的VH和含有SEQ ID NO:3中VL的VL。

18. 权利要求1或2所述的抗体或其片段,其包含含有SEQ ID NO:2中VH的VH和含有SEQ ID NO: 3中VL的变体的VL,其中在SEQ ID NO: 3的VL变体中的氨基酸残基32是选自以下的氨基酸:甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。

19. 权利要求15所述的抗体或其片段,其包含是SEQ ID NO:2中VH的VH和是SEQ ID NO: 9中VL的VL。

20. 一种抗体或其片段,其包含VL和VH,其中所述VL是SEQ ID NO:14的轻链中的VL且VH是选自SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:16的重链中的VH。

21. 权利要求1-20中任一项所述的抗体,其包含恒定区。

22. 权利要求21所述的抗体,其中所述恒定区是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

23. 一种药物组合物,其包含权利要求1-22中任一项所述的抗体或其片段和药学上可接受的载体。

24. 权利要求1-22中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于在有需要的主体中治疗自身免疫性疾病或慢性炎症。

25. 权利要求24所述的用途,其中所述自身免疫性疾病选自类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和系统性红斑狼疮。

26. 一种经分离的多核苷酸,其编码权利要求1-22中任一项所述的抗体或其片段。

27. 一种包含权利要求26所述的多核苷酸的细胞。

28. 一种生产抗体或其片段的方法,所述抗体或其片段能够结合TREM-1,所述方法包括在合适的条件下培养权利要求27所述的细胞。

定点诱变TREM-1抗体以降低黏度

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2015年7月17日；申请号：201580038005.6 (PCT/EP2015/066501)；发明名称：同上。

技术领域

[0002] 本发明涉及TREM-1 mAb,并涉及参与TREM-1 mAb自身相互作用或TREM-1 mAb与TREM-1相互作用的特定的带负电和不带电氨基酸的突变,以降低mAb溶液黏度并维持靶标亲和力,并且本发明涉及此类抗体在治疗和药物使用中的用途。

[0003] 本发明的序列表

SEQ ID NO:1 代表野生型(wt)人TREM-1的氨基酸序列。

SEQ ID NO:2 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(W02013/120553中的mAb 0170)。

SEQ ID NO:3 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(W02013/120553中的mAb 0170)。

SEQ ID NO:4 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0317,E27Q、E97S)。

SEQ ID NO:5 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0318,E27Q、E97Q)。

SEQ ID NO:6 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0319,E97S)。

SEQ ID NO:7 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0320,E97Q)。

SEQ ID NO:8 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0321,E27Q)。

SEQ ID NO:9 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0322,F32A)。

SEQ ID NO:10 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0323,F32S)。

SEQ ID NO:11 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(mAb 0324,A59Y)。

SEQ ID NO:12 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(mAb 0325,N57S)。

SEQ ID NO:13 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(mAb 0326,A59Y、N57S)。

SEQ ID NO:14 代表人源化TREM-1抗体的轻链的氨基酸序列(mAb 0330,F32A、E27Q、E97Q)。

SEQ ID NO:15 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(mAb 0332,A59Y; 0332是由SEQ ID NO: 15作为HC和SEQ ID NO 5作为LC组合而成的mAb, 表1)。

SEQ ID NO:16 代表人源化TREM-1抗体的重链的氨基酸序列(mAb 0333,A59Y; 0333是由SEQ ID NO: 16作为HC和SEQ ID NO 14作为LC组合而成的mAb, 表1)。

SEQ ID NO:17 代表全长cTREM-1的氨基酸序列。

SEQ ID NO 18代表mAb 0170的Fab区的重链。

SEQ ID NO 19代表mAb 0170的Fab区的轻链。

发明背景

TREM-1是在单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞上表达的活化受体。这些细胞通过释放驱动炎症的细胞因子和其它介质而在慢性炎症性疾病中起主要作用。TREM-1 mRNA和蛋白质表达在具有RA和IBD的患者中上调,且TREM-1阳性细胞在炎症部位积累,其与疾病严重程度相关。主要由活化的嗜中性粒细胞表达的肽聚糖识别蛋白1 (PGLYRP1)是TREM-1的配体,并在结合后介导TREM-1信号传导。

[0004] 在体外,TREM-1的参与触发促炎细胞因子(包括TNF、IL-8和单核细胞趋化蛋白-1)的分泌。另外,TREM-1信号传导与多种Toll-样受体(TLR)协同作用以进一步强化促炎信号。继而,其上调TREM-1的表达,导致恶性循环从而增强炎症。越来越多的证据表明TLR有助于慢性炎症性疾病诸如RA和IBD的发展和进程。

[0005] WO 2013/120553公开了人源化抗-TREM-1 mAb,其抑制人和食蟹猴TREM-1两者的功能。但是,抗-TREM-1 mAb的黏度概况可阻碍以>50 mg/ml生产药物产品的制备过程,并且可限制临床中的最优剂量设置。通常需要高剂量(若干 mg/kg)的蛋白质治疗剂以达到足够的临床效果,并且由于这些治疗剂的绝大多数通过皮下递送施用,因此所述治疗剂的患者自我施用受限于< 1.5 mL的体积(Shire 等人, J. Pharm. Sci. 2004, 93, 1390-1402)。当蛋白制剂导致所得溶液的高黏度时,开发适合用于患者自我施用的高浓度蛋白制剂通常受阻于制备和递送。

[0006] 已经针对在mAb溶液的黏度表现上的作用对mAb的电荷分布进行了研究(Ydav 等人, Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802)。同样,已经显示存在于稀释溶液中的弱的非特异性电荷相互作用影响浓缩的mAb溶液的黏度(Connolly 等人, Biophys. J., 2012, 103, 69-78.)。减少mAb溶液黏度的补救方法是引入破坏直接的电荷-电荷分子间相互作用的定点电荷交换突变(Ydav 等人, Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802)或添加盐或反离子(Liu 等人, J. Pharm. Sci. 2005, 94, 1928-1940; Yadav 等人, J. Pharm. Sci. 2010, 99, 1152-1168; Yadav 等人, J. Pharm. Sci. 2012, 101, 998-1011; Kanai 等人, J. Pharm. Sci. 2008, 97, 4219-4227)。但是,盐和反离子的添加可以就所施用溶液的高渗性而导致对患者的副作用。

[0007] 本文公开的是通过位点特异性突变在WO 2013/120553中公开的人源化抗-TREM-1 mAb 0170的CDR而生成的TREM-1抗体。本公开的抗体不破坏直接的mAb 分子间电荷-电荷自我相互作用,但是具有有利的黏度概况和维持的靶标结合概况。有利的黏度概况允许以高浓度生产药物产品,其对于治疗和药物使用将是关键的。此类抗体可以对患有脓毒病或慢性炎症疾病诸如类风湿性关节炎、银屑病关节炎和炎症性肠病的个体的生活质量具有实质影响。

[0008] 发明概述

本发明的主要方面涉及具有在单体mAb所期望的范围内的黏度概况的抗-TREM-1 mAb,且所述抗-TREM-1 mAb如WO 2013/120553的mAb0170一样有力地阻断TREM-1功能。在本发明的变体mAb的有利黏度概况以外,所述变体对TREM-1受体不具有激动作用。

[0009] 本发明的一个方面涉及能够结合并阻断TREM-1的抗体或其片段,其特征在于所述抗体或所述抗体的抗体片段在80 mg/mL的浓度下具有小于5 cP,优选小于4 cP的黏度。

[0010] 所述抗体或其片段可包括SEQ ID NO: 3的变体,其中SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区中的一个或多个带负电残基被不带电氨基酸残基取代,如本文所述。

[0011] 所述抗体或其片段可包括SEQ ID NO: 3的变体,其中在SEQ ID NO 3的位置32的苯丙氨酸被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸,优选地选自丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸和亮氨酸,更优选地其中SEQ ID NO: 3的F32被突变为丙氨酸或丝氨酸。

[0012] 所述抗体或其片段可包括SEQ ID NO: 2的变体,其中SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ ID NO 3的F32、D33、Y34、Y53、R54、D98中的一个残基(“Fab-Fab相互作用”突变)被另一种氨基酸取代,所述另一种氨基酸是诸如天然氨基酸,优选地选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

[0013] 本发明的另外的方面涉及抗体或其片段,其能够特异性地结合并阻断SEQ ID NO: 1的TREM-1并且包括SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3或两者的变体,其中所述变体选自SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的“Fab-Fab相互作用”突变、“Fab-TREM-1相互作用”突变和“电荷-补丁(charge-patch)”突变(表1)。

[0014] 在本发明的抗体或其片段的一个实施方案中,SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区中的一个或多个带负电残基被不带电氨基酸残基取代。在一个实施方案中,SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区中的带负电残基被不带电氨基酸残基取代。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其片段包括SEQ ID NO: 3的变体,其中SEQ ID NO: 3的“电荷补丁”残基D1、D30、D33、D74、D98、E27、E97中的任一个被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。在一个实施方案中,SEQ ID NO 3的“电荷补丁”残基D1、D30、D33、D74、D98、E27、E97中的不止一个被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

[0016] 在一个实施方案中,SEQ ID NO 3的CDR1和CDR3区的E27和E97之一被不带电氨基酸残基取代,所述不带电氨基酸诸如选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。譬如,SEQ ID NO 3的E27可以保持未突变且E97可以被突变为选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸,更优选突变为选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸。可选地,SEQ ID NO 3的E97可以保持未突变且E27可以被选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸取代,更优选被选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸取代。

[0017] 在一个实施方案中,SEQ ID NO 3的CDR1和CDR3区的E27和E97两者均被不带电氨基酸残基取代,所述不带电氨基酸诸如选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。譬如,SEQ ID NO 3的E27可以被突变为谷氨酰胺且SEQ ID NO 3的E97可以被选自甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸取代,更优选被选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸取代。在本发明的的抗体或片段的一个实施方案中,SEQ ID NO: 3的E97被突变为谷氨酰胺且E27被选自甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸取代,更优选地被选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸取代。譬如,SEQ ID NO: 3的E27和E97可以同时被突变为谷氨酰胺。

[0018] 在另外的方面,本发明提供了抗体或其片段,其包括SEQ ID NO: 2的变体,其中SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ ID NO 3的F32、D33、

Y34、Y53、R54、D98中的任一个残基(“Fab-Fab相互作用”突变)被另一种氨基酸取代,所述另一种氨基酸是诸如天然氨基酸,优选地选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

[0019] 在本发明的抗体或其片段的一个实施方案中,SEQ ID NO: 2的残基A59和N57中的至少一个被突变为氨基酸残基诸如天然氨基酸,优选选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,更优选丝氨酸或酪氨酸。譬如,SEQ ID NO: 2的A59可以保持未突变且N57可以被突变为另一种氨基酸残基诸如天然氨基酸,优选选自以下:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,更优选丝氨酸或酪氨酸。可选地,SEQ ID NO: 2的N57可以保持未突变且SEQ ID NO 2的A59可以被突变为另一种氨基酸残基诸如天然氨基酸,优选选自以下:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,更优选丝氨酸或酪氨酸。在另外的实施方案中,SEQ ID NO: 2的A59和N57两者均被突变为另一种氨基酸残基诸如天然氨基酸,优选选自以下:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,更优选丝氨酸或酪氨酸。

[0020] 本发明的另外的方面涉及改善的临床前评价价值,所述值通过在SEQ ID NO: 3中的“Fab-TREM-1相互作用”氨基酸残基处引入定点突变以达到对食蟹猴TREM-1的mAb亲和力与其对SEQ ID NO: 1的人TREM-1的mAb亲和力相同而获得,诸如,其中SEQ ID NO: 3的Phe残基被Ala或Ser取代。

[0021] 本发明因此提供了抗体或其片段,其中“Fab-TREM-1相互作用”氨基酸残基,SEQ ID NO: 3的F32,被选自以下的氨基酸残基取代:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸和半胱氨酸。

[0022] 本发明的另外的方面涉及改善的黏度特性和改善的临床前评价价值的组合效果,所述组合效果通过在SEQ ID NO: 2的mAb-TREM-1交界面引入定点突变以实现了对食蟹猴和对SEQ ID NO: 1的人TREM-1的相同的mAb亲和力(例如上文所述)连同将SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区中的带负电残基取代为不带电氨基酸残基(例如上文所述)而获得。

[0023] 根据本发明的任意上述方面,在此提供了抗体或其片段,其中:

i) SEQ ID NO 3的CDR1和CDR3区的至少一个带负电残基被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸;并且

ii) SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ. ID NO 3的F32、D33、Y34、Y53、R54、D98中的至少一个残基(“Fab-Fab相互作用”突变)被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸和色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

[0024] 在一个实施方案中,在此提供了抗体或其片段其中:

i) SEQ ID NO 3的E27和E97之一或两者被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸;且

ii) SEQ ID NO 2的A59和N57之一或两者被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,更优选丝氨酸或酪氨酸。

[0025] 本发明还涉及包含SEQ ID NO 4至16中任一项的抗体或其片段。

[0026] 附图简述

图1描述了抗-TREM-1 mAb变体的黏度概况及其指数曲线拟合。

[0027] 图2描述了mAb 0170变体抑制由PGN和(A)重组PGLYRP1或(B)由活化的嗜中性粒细胞表达的PGLYRP1刺激的人TREM-1受体细胞系(BWZ'36/hTREM-1)中人TREM-1信号传导的能力(N个供体的平均)。

[0028] 图3描述了mAb 0170变体抑制由PGN和重组PGLYRP1刺激的食蟹猴TREM-1受体细胞系(TE426.27)中食蟹猴TREM-1信号传导的能力。

[0029] 图4描述了mAb 0170变体抑制由PGN和重组PGLYRP1刺激的低氧M2巨噬细胞TNF α 释放的能力。

[0030] 图5描述了平板结合的mAb 0170变体诱导从低氧M2巨噬细胞的TNF释放的激动潜力。MAb 1278 (R&D)被用作阳性对照。

[0031] 图6描述了相比mAb 0170,抗-TREM-1 mAb变体的流体动力学半径。

[0032] 发明详述

TREM-1是由234个氨基酸组成的跨膜蛋白,其包括单个胞外免疫球蛋白结构域和一个没有明显信号基序的短胞质尾区。当活化时,TREM-1与含有ITAM的信号衔接蛋白DAP12结合。下游信号传导可以包括NFAT转录因子的活化,其引起促炎细胞因子产量的上调。

[0033] 本发明涉及能够特异性结合并阻断TREM-1功能的抗体。本发明的抗体可以通过减少/阻断TREM-1活化和下游信号传导来阻断TREM-1功能。

[0034] 根据本发明的抗体可以通过直接或间接阻断TREM-1的一种机制或数种不同机制的组合来阻断TREM-1。例如,本发明的抗体可以防止TREM-1的天然配体,肽聚糖识别蛋白1(PGLYRP1)与TREM-1生成功能复合体和/或本发明的抗体可以通过防止单独的TREM-1分子形成二聚体或多聚体而阻断TREM-1。TREM-1二聚化或多聚化可以通过TREM-1抗体来减少或防止,所述TREM-1抗体能够结合TREM-1的部分,该部分否则将驻留于TREM-1二聚体接触面,因此防止了单独的TREM-1分子彼此结合。

[0035] TREM-1二聚化或多聚化可以通过TREM-1抗体来减少或防止,所述TREM-1抗体干扰TREM-1与其配体的相互作用。根据本发明的抗体可以阻断TREM-1的PGLYRP1-诱导的活化。PGLYRP1,一种高度保守的、长196个氨基酸的蛋白质,由信号肽和肽聚糖结合结构域组成,其在嗜中性粒细胞中表达并在细胞活化后释放。根据本发明的抗体可以下调从骨髓瘤细胞释放促炎细胞因子。根据本发明的抗体可以阻断从巨噬细胞、嗜中性粒细胞、滑膜组织细胞和/或报道细胞释放TNF、MIP-1 β 、MCP-1、IL-1 β 、GM-CSF、IL-6和/或IL-8,如本文所公开。

[0036] 本发明的抗体可能能够结合人TREM-1和来自不同于人的其它物种的TREM-1。如本文所用的术语“TREM-1”因此涵盖了TREM-1的任何天然存在的形式,其可以来源于任何合适的生物体。例如,如本文所述使用的TREM-1可以是脊椎动物的TREM-1,诸如哺乳动物TREM-1,诸如来自灵长类动物(诸如人、黑猩猩、食蟹猴或猕猴)的TREM-1;啮齿类(诸如小鼠或大鼠)、兔类(诸如兔)或偶蹄类(诸如牛、绵羊、猪或骆驼)。优选地,所述TREM-1是SEQ ID NO: 1(人TREM-1)。所述TREM-1可以是TREM-1的成熟形式诸如已经在合适的细胞中经历了翻译后加工的TREM-1蛋白。此类成熟TREM-1蛋白可以是例如,被糖基化的。所述TREM-1可以是全长TREM-1蛋白。

[0037] 本发明的抗体可以是单克隆抗体,在这个意义上而言它们直接或间接地来源于B淋巴细胞的单个克隆。TREM-1抗体可以使用例如W02013/120553的实施例中描述的方法产生、筛选和纯化。简而言之,可以使用TREM-1、表达TREM-1的细胞或两者的组合对合适的小鼠诸如TREM-1或TREM-1/TREM-3敲除(KO)小鼠进行免疫。

[0038] 本发明的抗体可以是多克隆的,在这个意义上而言其是根据本发明的单克隆抗体的混合物。

[0039] 杂交瘤上清液的初步筛选可以使用直接ELISA或FMAT进行,且二次筛选可以使用流式细胞术进行。阳性杂交瘤上清液可以随后在报道基因测定中筛选。

[0040] 抗体可以在原核或真核细胞中重组表达。所述原核细胞可以是大肠杆菌(*E. coli*)。所述真核细胞可以是酵母、昆虫或哺乳动物细胞,诸如来源于灵长类(诸如人、黑猩猩、食蟹猴或猕猴)、啮齿类(诸如小鼠或大鼠)、兔类(诸如兔)或偶蹄类(诸如牛、绵羊、猪或骆驼)的生物体的细胞。合适的哺乳动物细胞系包括,但不限于HEK293细胞、CHO细胞和HELA细胞。TREM-1抗体还可以通过本领域技术人员已知的其他方法产生,诸如噬菌体展示或酵母展示。

[0041] 一旦产生,可以使用W02013/120553的实施例中描述的方法针对结合例如全长TREM-1或其突变体来筛选抗体。

[0042] 本发明的功能TREM-1抗体是这样的抗体,其能够特异性结合TREM-1并且通过阻断或刺激TREM-1而对TREM-1活化和下游信号传导产生影响,并且它们在本文中被称为“功能性TREM-1抗体”。鉴定功能性TREM-1抗体的方法包括(a)培养表达TREM-1的第一细胞、信号蛋白和报道构建体;(b)当所述第一细胞与TREM-1改性剂温育时测量所述细胞的活性;(c)将(b)共培养物与TREM-1抗体接触;和(d)测量所述第一细胞的活性小于或大于(b)中测得的活性。

[0043] (a)的所述“第一细胞”可以是造血来源的细胞,诸如骨髓细胞,诸如T-细胞。(a)的所述信号蛋白可以是能够与TREM-1形成复合体的任何信号蛋白。合适的信号蛋白包括DAP10、DAP12、TCR ζ 、Fc γ RIII和Fc受体或其部分。(a)的所述受体构建体可以是能够经由信号蛋白活化并生成可识别的信号的任何构建体。合适的报道构建体包含转录因子和报道基因。所述信号蛋白可以经由选自NFAT和NF κ B的转录因子传导信号。所述报道基因不是在所述第一细胞中天然表达的基因,并且可以是但不限于是编码 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)或氯霉素转移酶的基因。所述第一细胞可以使用本领域熟知的方法用转录因子和报道基因转染。

[0044] 实施例中描述的“BWZ/hTREM-1报道细胞”和“TE426.27报道细胞”是“第一细胞”的一个实例。

[0045] (b)的所述改性剂可以是TREM-1配体或活化的嗜中性粒细胞。(c)的所述“TREM-1抗体”可以是TREM-1特异性杂交瘤上清液或纯化的抗体。(d)中测量的活性是由报道构建体产生的信号。此类信号传导的实例是由NFAY驱动LacZ(β -内酰胺酶萤光素酶)产生引起的发光。

[0046] 可以调整所述方法以鉴定阻断TREM-1的抗体。鉴定阻断TREM-1的抗体的方法包括(a)培养表达TREM-1的第一细胞、信号蛋白和报道构建体;(b)当所述第一细胞与活化的嗜中性粒细胞温育时测量所述细胞的活性;(c)将所述第一细胞和活化的嗜中性粒细胞的共

培养物与TREM-1抗体接触;和(d)测量所述第一细胞的活性小于(b)中测得的活性。

[0047] 还可以调整所述方法以鉴定刺激TREM-1的抗体。鉴定刺激TREM-1的抗体的方法包括(a)培养表达TREM-1的第一细胞、信号蛋白和报道构建体;(b)测量所述第一细胞的活性;(c)将所述细胞与TREM-1抗体接触/温育;和(d)测量所述第一细胞的活性大于(b)中测得的活性。

[0048] 本发明涉及阻断TREM-1的抗体,其可以通过本文公开的鉴定阻断抗体的方法来鉴定。当使用上文所述的方法和在实施例中测试时,根据本发明的抗体可以在小于50 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于40 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于30 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于20 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于10 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于5 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度 - 能够减少所述第一细胞50%、诸如60%、诸如70%、诸如80%、诸如90%、诸如95%、诸如100%的活性。根据本发明的抗体可能完全消除所述第一细胞的活性。当使用上文所述的方法和在实施例中测试时,根据本发明的抗体可以在小于1 $\mu\text{g/ml}$ - 诸如小于0.9 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.8 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.7 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.6 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.3 $\mu\text{g/ml}$ 、诸如小于0.2 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度 - 能够消除所述第一细胞的活性。

[0049] 本发明还涉及阻断TREM-1的抗体,其可以通过本文公开方法以外的其它方式来鉴定。

[0050] 本文的术语“抗体”指的是一种蛋白,其衍生自种系免疫球蛋白序列,其能够特异性地结合抗原(TREM-1)或其部分。术语包括任何类或同种型(即,IgA、IgE、IgG、IgM和/或IgY)的全长抗体或其任何单链或片段。特异性结合至抗原或其部分的抗体可以专一地结合至所述抗原或其部分,或其可以结合至有限数量的同源抗原或其部分。全长抗体通常包括至少四条多肽链:两条重(H)链和两条轻(L)链,其通过二硫键相互连接。具有特别药物兴趣的一种免疫球蛋白亚类是IgG家族。在人中,所述IgG类可以被细分为4个亚类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,基于它们的重链恒定区的序列。轻链可以被分为两类, κ 和 λ ,基于它们的序列组成的差异。IgG分子由两条重链(通过两个或更多个二硫键相互连接)和两条轻链构成(各自通过二硫键与一条重链连接)。重链可以包括重链可变区(VH)和多达三个重链恒定(CH)区:CH1、CH2和CH3。轻链可以包括轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。VH和VL区可以进一步细分为高变区,被称为互补决定区(CDR),其散布在更保守的区间,所述更保守的区被称为框架区(FR)。VH和VL区通常由三个CDR和四个FR构成,以以下顺序从氨基端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的高变区形成能够与抗原相互作用的[结合]结构域,同时抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,其包括但不限于免疫系统的各种细胞(效应器细胞)、Fc受体和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0051] 本发明的抗体可以是经分离的。术语“经分离的抗体”指的是已经从产生其的环境中与其它组分相分离和/或回收的抗体,和/或已经从产生其的环境存在的组分的混合物中纯化的抗体。

[0052] 抗体的某些抗原结合片段可能适合本发明的背景,因为已经证明,抗体的结合功能可以通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合片段”指的是抗体的一个或多个片段,其保留了特异结合至抗原诸如TREM-1的能力,如本文描述的。抗原结合片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、F(ab)S、Fv(通常为抗体单臂的VL和VH域)、单链Fv(scFv;参见,例如Bird等人, Science 1988; 242:42S-426; and Huston等人 PNAS 1988; 85:5879-

5883)、dsFv、Fd (通常为VH和CHI域)和dAb (通常为VH域)片段;VH、VL、VhH和V-NAR域;包含单独VH和单独VL链的单价分子;微抗体、双体、三体、四体和κ体(参见,例如I11 等人, Protein Eng 1997;10:949-57);骆驼IgG;IgNAR;以及一种或多种经分离的CDR或功能互补位,其中经分离的CDR或抗原结合残基或多肽可以结合或一同连接,从而形成功能性抗体片段。抗体片段的各种类型已经在例如Holliger和Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136;W02005040219和公开的美国专利申请20050238646和20020161201中描述或综述。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以筛选片段用于在如完整抗体的相同方式中使用。

[0053] 本发明的抗体可以是人抗体或人源化抗体。如本文所用的,术语“人抗体”意图包括具有可变区中框架区的至少部分和/或CDR区的至少部分衍生自人种系免疫球蛋白序列的抗体。(例如,人抗体可以具有框架和CDR区两者均衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区。)此外,如果抗体含有恒定区,所述恒定区还衍生自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0054] 此类人抗体可以是人单克隆抗体。此类人单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,所述杂交瘤包括得自转基因非人动物(例如,转基因小鼠)的B细胞,其具有融合至永生化细胞的包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0055] 人抗体可以分离自基于人种系序列的选择建立的序列文库,其进一步使用天然和合成序列多样性进行多样化。

[0056] 人抗体可以通过人淋巴细胞的体外免疫随后使用埃巴病毒转化来制备。

[0057] 术语“人抗体衍生物”指的是人抗体的任何修饰形式,诸如抗体或其它剂或抗体的缀合物。

[0058] 如本文使用的术语“人源化抗体”指的是人/非人嵌合抗体,其含有衍生自非人免疫球蛋白的一种或多种序列(CDR区或其部分)。因此,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的至少数个残基被来自非人物种的抗体(供体抗体,诸如来自小鼠、大鼠、兔或非人哺乳动物)的高变区的数个残基取代,所述人源化抗体具有期望的特异性、亲和力、序列组成和功能性。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基取代。此类修饰的一个实例是引入一种或多种所谓的回复突变,其中氨基酸通常来源于供体抗体。抗体的人源化可以使用本领域技术人员已知的重组技术实施(参见,例如 Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, edited by Benny K. C. Lo)。轻链和重链可变域的合适的人受体框架可以通过例如测序或结构同源性鉴定。可选地,可以基于例如结构、生物物理学和生物化学特性的认知而使用固定的受体框架。受体框架可以是衍生自种系或衍生自成熟抗体序列。来自供体抗体的CDR区可以通过CDR移植进行转移。CDR移植的人源化抗体可以进一步通过鉴定关键框架位置对例如亲和力、功能性和生物物理特性进行优化,其中在所述位置的来自供体抗体的氨基酸残基的再引入(回复突变)对人源化抗体的特性具有有利影响。除了供体抗体衍生的回复突变,人源化抗体可以通过在CDR或框架区引入种系残基、消除免疫原性表位、定点诱变、亲和力成熟等进行工程改造。

[0059] 此外,人源化抗体可以包含受体抗体或供体抗体中不存在的残基。可以进行这些

修饰以进一步改善抗体表现。通常,人源化抗体将包含至少一个,通常两个可变结构域,其中CDR区的全部或基本全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且其中FR残基的全部或基本全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体可以,任选地,还包含免疫球蛋白(通常是人免疫球蛋白的)恒定区(Fc)的至少部分。

[0060] 术语“人源化抗体衍生物”指的是人源化抗体的任何修饰形式,诸如抗体或其它试剂或抗体的缀合物。

[0061] 如本文使用的术语“嵌合抗体”指的是其轻链和重链基因已经被来自不同物种起源的免疫球蛋白可变和恒定区基因构建(通常通过基因工程改造)的抗体。例如,来自小鼠单克隆抗体的基因的可变区段可以连接至人恒定区段。

[0062] 抗体的片段可结晶区(“Fc区”/“Fc结构域”)是抗体的N-端区,其包括恒定CH2和CH3结构域。所述Fc结构域可以与称为Fc受体的细胞表面受体,以及补体系统的一些蛋白相互作用。所述Fc区使得抗体能够与免疫系统相互作用。在本发明的一个方面中,抗体可以经工程改造以包括Fc区内的修饰,这通常改变其一项或多项功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合、蛋白稳定性和/或抗原依赖性细胞毒性,或尤其是其缺乏。此外,本发明的抗体可以经化学修饰(例如,可以将一个或多个化学部分连接至抗体),或所述抗体可以经修饰以改变其糖基化,再次改变所述抗体的一项或多项功能特性。IgG抗体可以携带包括以下一个或多个,且也许全部突变的经修饰的Fc结构域,所述突变将分别导致对某些Fc受体(L234A、L235E和G237A)的亲和力降低和减少C1q介导的补体结合(A330S和P331S)(残基编号根据EU索引)。

[0063] 本发明的抗体的同种型可以是IgG,诸如IgG1、诸如IgG2、诸如IgG4。如果期望,抗体的类型可以通过已知技术“转换”。例如,原本作用IgM分子产生的抗体可以类别转换为IgG抗体。类别转换技术还可以用于将一种IgG亚类转换为另一种,例如:从IgG1至IgG2或IgG4;从IgG2至IgG1或IgG4;或从IgG4至IgG1或IgG2。也可以通过将来自不同IgG亚类的区组合来执行抗体的工程改造,以生成恒定区嵌合分子。

[0064] 在一个实施方案中,CH1的铰链区被修饰,使得铰链区中半胱氨酸残基的数量变化,例如,增加或减少。该方法进一步描述于例如由Bodmer等人的美国专利号5,677,425中。

[0065] 该恒定区可以经修饰以稳定抗体,例如,以降低二价抗体分离为两个单价VH-V1片段的风险。例如,在IgG4恒定区中,残基S228(残基编号根据EU索引)可以被突变为脯氨酸(P)残基以稳定在所述铰链形成的重链间二硫桥键(参见,例如Angal 等人, Mol Immunol. 1995; 30: 105-8)。

[0066] 抗体或其片段还可以根据它们的互补决定区(CDR)进行限定。当在本文中使用时,术语“互补决定区”或“高变区”指的是其中参与抗原结合的氨基酸残基所在的抗体区。高变区或CDR可以被鉴定为在抗体可变区的氨基酸排列中具有最高可变性的区。数据库可以用于CDR鉴定,诸如Kabat数据库,CDR例如被限定为包括轻链可变域的氨基酸残基24-34(L1)、50-59(L2)和89-97(L3)和重链可变域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);(Kabat 等人 1991; Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。可选地,CDR可以被定义为来自“高变环”的那些残基(轻链可变域中的残基26-33(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)和重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101

(H3)); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196: 901-917)。通常,在该区中的氨基酸残基的编号通过Kabat等人,同上中描述的方法执行。术语诸如“Kabat位置”、“Kabat残基”和“根据Kabat”在本文中指的是用于重链可变域或轻链可变域的这种编号系统。使用Kabat编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可以含有更少的或另外的氨基酸,其对应于可变域的框架(FR)或CDR的缩短、插入。例如,重链可变域可以包括在CDR H2的残基52之后的氨基酸插入(根据Kabat的52a、52b和52c),和在重链FR残基82后插入的残基(根据Kabat例如82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列的序列的同源区与“标准”Kabat编号对比,对给出的抗体确定残基的Kabat编号。

[0067] 如本文所定义的,术语“框架区”或“FR”残基指的是那些不在CDR中的VH或VL氨基酸残基。

[0068] mAb 0170抗体具有如SEQ ID NO: 2所示的可变重链序列和如SEQ ID NO: 3所示的可变轻链序列。本发明的抗体可以包括该可变重链序列和/或该可变轻链序列。mAb 0170抗体具有SEQ ID NO: 2的氨基酸31至35、50至68和101至110以及SEQ ID NO: 3的氨基酸24至38、54至60和93至101所示的CDR序列。

[0069] 根据本发明的重链可包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸31至35(TYAMH)的CDR1序列,其中这些氨基酸之一可以被不同的氨基酸取代。

[0070] 根据本发明的重链可包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸50至68(RIRTKSSNYATYYADSVKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0071] 根据本发明的重链可包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸101至110(DMGQRRQFAY)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0072] 根据本发明的轻链可包含具有SEQ ID NO: 3的氨基酸24至38(RASESVDTFDYSFLH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0073] 根据本发明的轻链可包含具有SEQ ID NO: 3的氨基酸54至60(RASNLES)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0074] 根据本发明的轻链可包含具有SEQ ID NO: 3的氨基酸93至101(QQSNEDPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0075] mAb 0170抗体具有如SEQ ID NO: 2所示的重链序列和如SEQ ID NO: 3所示的轻链序列。本发明的抗体可包含该重链序列和/或该轻链序列。本发明的抗体的重链或轻链或两者可以是mAb 0170的变体。mAb 0170抗体具有SEQ ID NO: 2的氨基酸31至35、50至68和101至110以及SEQ ID NO: 3的氨基酸24至38、54至60和93至101所示的CDR序列。本发明的抗体可包含这些CDR序列中的1、2、3、4、5或全部6个。

[0076] 根据本发明的重链可包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸101至110(DMGIRRQFAY)的CDRH3序列,其中这些氨基酸中的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0077] 术语“抗原”(Ag)指的是用于对免疫活性脊椎动物免疫以产生识别所述Ag的抗体的分子实体。本文中,Ag更广泛地表示且通常意图包括由Ab特异性识别的靶标分子,因此其包括用于免疫过程中,或其它过程例如噬菌体展示中的分子的片段或模拟物,用于生成所述Ab。

[0078] 如本文使用的术语“表位”,是在“抗原结合多肽”(诸如抗体(Ab))与其对应的抗原

(Ag)之间的分子相互作用的背景下定义的。一般地,“表位”指的是Ag上的范围或区,其是Ab特异性结合的,即所述范围或区与所述Ab物理接触。对于Ab和Ag分子中的原子,物理接触可以通过多个标准限定(例如,截止距离为2-6Å、诸如3Å、诸如4 Å、诸如5Å;或溶液可及性)。蛋白表位可以包括直接参与结合至Ab的Ag中的氨基酸残基(也被称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其它氨基酸残基,诸如由Ab有效阻断的Ag的氨基酸残基,即在Ab的“溶剂排除面”和/或“足迹”中的氨基酸残基。

[0079] 本文的术语表位包括特异性结合至TREM-1抗体的TREM-1的任何特定区中的结合区的类型。TREM-1可以包括多种不同表位,其可以包括但不限于,由位于成熟TREM-1构象中的彼此临近的一个或多个非连续氨基酸组成的构象表位和由共价结合至TREM-1的分子结构,诸如碳水化合物基团中全部或部分组成的翻译后表位。

[0080] 给定抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位可以使用实验性和计算机的表位作图方法在不同细节水平描述和表征。实验性方法包括诱变、X-射线、晶体学、核磁共振(NMR)光谱学、氢-氘交换质谱法(HX-MS)和本领域已知的各种竞争结合方法。由于每种方法依赖于其独特的原理,因此表位的描述与用于确定其的方法密切相关。因此,取决于采用的表位作图方法,可以区别地描述给定的抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位。

[0081] 在最详细的水平,Ag和Ab之间相互作用的表位可以通过定义Ag-Ab相互作用中存在的原子接触的空间坐标,以及关于它们对结合热力学的相对作用的信息进行描述。在较不详细的水平,表位可以通过定义在Ag和Ab之间的原子接触的空间坐标进行表征。在甚至更不详细的水平,表位可以通过含有通过具体标准定义的氨基酸残基进行表征,所述具体标准诸如Ab:Ag复合体中原子间距离或溶剂可及性。在进一步更不详细的水平看,表位可以通过功能,例如与其它Ab的竞争结合进行表征。表位还可以更一般地定义为包含这样的氨基酸残基,其被另一种氨基酸所取代将改变Ab和Ag之间相互作用的特征。

[0082] 在通过Ab(例如Fab片段)和其Ag之间的复合物的空间定位定义X-射线衍生的晶体结构的背景下,除非另有明确说明或与上下文矛盾,本文中的术语表位具体地定义为这样的TREM-1残基,其特征在于具有与Ab中重原子距离为例如4 Å以内的重原子(即非氢原子)。

[0083] 取决于使用的表位作图方法,所获得的表位的描述和定义事实上具有不同的详细水平,相似地,可以在不同的详细水平比较同一Ag上针对不同Ab的表位。

[0084] 如果表位含有相同的氨基酸残基布置,则在氨基酸水平描述的(例如通过X-射线结构确定)表位被认为是相同的。如果表位共享至少一个氨基酸,则表位被认为是重叠的。如果表位没有共享的氨基酸,则表位被认为是单独的(独特的)。

[0085] 表位还可以通过比较抗体对野生型人TREM-1和那些人TREM-1变体(其在预期的表位具有丙氨酸突变)的结合动力学的方式间接定义。抗体对一个氨基酸残基已经被一个丙氨酸残基替换的人TREM-1变体的亲和力降低或结合消除指示突变的氨基酸有助于所述抗体和野生型人TREM-1之间的相互作用。该方法提供了对表位的否定识别。由于蛋白质错误折叠或未折叠将给出类似于消除相互作用的结果,所述方法削弱了对表位的有效定义。如果存在交叉反应抗体,分析可以通过直系同源靶蛋白(例如食蟹猴TREM-1)的功能突变分析的比较增益进行补充。所述比较将定义不与例如,食蟹猴TREM-1交叉反应的抗体和交叉反应的抗体之间的表位差异。

[0086] 还可以通过测量结合至野生型抗原(TREM-1)的变体的抗体(或其片段)提供表位

的间接鉴定。如果抗体或其片段结合例如人TREM-1,但不结合食蟹猴TREM-1,并且如果所述抗体或其片段能够结合食蟹猴TREM-1的部分人源化变体,则该恢复的结合指示所取代的氨基酸残基对于抗体与抗原相互作用是重要的。同样地,抗人TREM-1抗体(或其片段)对食蟹猴TREM-1的人源化变体增加的亲和力对食蟹猴TREM-1具有相比人TREM-1更弱的结合,这可以提供构成结合表位的残基的身份信息。

[0087] 相同突变在任何给出的交叉反应抗体上的效果使得有可能区分可能的蛋白错误折叠(消除了对两种抗体的结合)和人TREM-1相互作用的丧失(结合抗体之一并消除了对另一抗体的结合),同时清楚地提供了表位在不发生交叉反应的抗体和交叉反应的抗体之间在氨基酸水平上的差异。

[0088] 本发明的抗体可以如使用例如表面等离子体共振确定的,能够结合人TREM-1的变体。

[0089] 本发明的抗体可以如使用例如表面等离子体共振确定的,能够结合食蟹猴TREM-1的变体。

[0090] 本发明的抗体可能特异性结合TREM-1,其中所述抗体能够特异性结合人TREM-1的(i)选自以下的至少一种氨基酸残基:A21、T22、K23、L24、T25、E26,和(ii)选自以下的至少一种氨基酸残基A49、S50、S51、Q52、K53、A54、W55、Q56、I57、I58、R59、D60、G61、E62、M63、P64、K65、T66、L67、A68、C69、T70、E71、R72、P73、S74、K75、N76、S77、H78、P79、V80、Q81、V82、G83、R84、I85,和(iii)选自以下的至少一种氨基酸残基C113、V114、、I115、Y116、Q117、P118和P119。

[0091] 本发明的抗体可能特异性结合包含SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸D38至F48的多肽,如使用例如,HX-MS或X-衍射确定的。

[0092] 本发明的抗体可以具有这样的表位,其包含SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸残基D38, V39、K40、C41、D42、Y43、T44和L45中一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部以及选自SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸残基E46、K47和F48中的一个、两个或全部,如使用例如,HX-MS或X-衍射确定的。

[0093] 本发明的抗体可以具有这样的表位,其包含选自SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸残基D42、E46、D92和H93中的一个、两个、三个或全部,如使用TREM-1的变体和表面等离子体共振确定的。

[0094] 本发明的抗体可以具有这样的表位,其包含至少SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸残基E46和/或D92,如使用TREM-1的变体和表面等离子体共振确定的。

[0095] 本发明的抗体还可以包含选自SEQ ID NO: 1(人TREM-1)的氨基酸残基L31、I86和V101中的一个、两个或全部。

[0096] 本发明的抗体可能特异性结合包含食蟹猴TREM-1(SEQ ID NO: 17)的氨基酸残基E19至L26的多肽,如使用例如,HX-MS或X-衍射确定的。

[0097] 本发明的抗体可能特异性结合人TREM-1,其中所述抗体的表位包含选自SEQ ID NO: 1的氨基酸残基V39、K40、C41、D42、Y43、L45、E46、K47、F48和A49中一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或全部。

[0098] 本发明的抗体可能特异性结合人TREM-1,其中所述抗体的表位包含SEQ ID NO: 1的D42。本发明的抗体可能特异性结合人TREM-1,其中所述抗体的表位包含SEQ ID NO:

1的E46。所述抗体的表位可以包含SEQ ID NO: 1的V39、C41、D42、Y43、L45。所述抗体的表位可以包含SEQ ID NO: 1的E46、K47和A49。所述抗体的表位还可以包含SEQ ID NO: 1的F48。

[0099] 术语“配位”的定义通过翻转视角而衍生自“表位”的上述定义。因此，术语“配位”指的是抗体上抗原特异性结合的范围或区，即所述范围或区与抗原物理接触。

[0100] 在通过抗体（诸如Fab片段）和其抗原之间的复合物的空间定位定义X-射线衍生的晶体结构的背景下，除非另有明确说明或与上下文矛盾，本文中的术语配位具体地定义为这样的抗原残基，其特征在于具有与TREM-1中重原子距离为例如4 Å以内的重原子（即非氢原子）。

[0101] 给定抗体（Ab）/抗原（Ag）对的表位和配位可以通过常规方法鉴定。例如，表位的一般位置可以通过评价抗体结合至TREM-1多肽的不同片段或变体的能力来确定。TREM-1内与抗体接触的特定氨基酸（表位）和抗体中与TREM-1接触的特定氨基酸（配位）还可以使用常规方法确定。例如，抗体和靶分子可以结合，且Ab:Ag复合物可以结晶化。可以确定所述复合物的结晶结构并且所述晶体结构可以用于鉴定抗体和其靶标之间相互作用的特定位点。

[0102] 结合至相同抗原的抗体可以对它们同时结合至它们的共同抗原的能力进行表征，并且可以经历“竞争结合”/“建箱（binning）”。在本发明背景下，术语“建箱”指的是将结合相同抗原的抗体分组的方法。抗体的“建箱”可以基于在测定中两种抗体对它们的共同抗原的竞争结合，所述测定基于标准技术诸如表面等离子体共振（SPR）、ELISA或流式细胞术。

[0103] 一个抗体的“箱”使用参考抗体进行定义。如果第二抗体不能与参考抗体同时结合一种抗原，则所述第二抗体被认为属于参考抗体的相同“箱”。在该情况中，参考抗体和第二抗体竞争结合抗原的相同部分，且造成“竞争抗体”。如果第二抗体能够与参考抗体同时结合一种抗原，则所述第二抗体被认为属于分别的“箱”。在该情况中，参考抗体和第二抗体不竞争结合抗原的相同部分，且造成“非竞争抗体”。

[0104] 抗体“建箱”不提供关于表位的直接信息。竞争抗体，即属于相同“箱”的抗体可以具有相同表位、重叠表位或甚至分别的表位。后者的情况是如果结合至其抗原表位的参考抗体占据了所述第二抗体与其在抗原上的表位接触所需的空间（“空间位阻”）。非竞争抗体通常具有分别的表位。

[0105] 本发明的抗体可以与mAb 0170竞争结合人TREM-1。本发明的抗体可以与mAb 0170竞争结合食蟹猴TREM-1。换言之，本发明的抗体可能与mAb 0170属于同一“箱”。

[0106] 本文的术语“结合亲和力”指的是两分子（例如抗体或其片段与抗原）之间非共价相互作用强度的度量。术语“结合亲和力”被用于描述单价相互作用（固有活性）。

[0107] 两分子（例如抗体或其片段和抗原）之间通过单价相互作用的结合亲和力可以通过平衡解离常数（ K_D ）的测定来定量。继而， K_D 可以通过复合物形成和解离的动力学的度量来确定，例如通过SPR方法。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别指的是结合速率常数 k_a （或 k_{on} ）和解离速率常数 k_d （或 k_{off} ）。 K_D 通过方程式 $K_D = k_d / k_a$ 涉及 k_a 和 k_d 。

[0108] 根据上文定义，与不同分子相互作用有关的结合亲和力，诸如不同抗体对给定抗原的结合亲和力的比较，可以通过比较各自的抗体/抗原复合物的 K_D 值进行比较。

[0109] 本发明的抗体可以 1×10^{-7} M或更小、 1×10^{-8} M或更小、或 1×10^{-9} M或更小、或 1×10^{-10} M或更小、 1×10^{-11} M或更小、 1×10^{-12} M或更小、或 1×10^{-13} M或更小的亲和力（ K_D ）与人TREM-1结合，如使用表面等离子体共振确定的。本发明的抗体可以 1×10^{-7} M或更小、 $1 \times$

10^{-8} M或更小、或 1×10^{-9} M或更小、或 1×10^{-10} M或更小、 1×10^{-11} M或更小、 1×10^{-12} M或更小、或 1×10^{-13} M或更小的亲和力(K_D)与食蟹猴TREM-1结合,如使用表面等离子体共振确定的。

[0110] 本文的术语“结合特异性”指的是分子诸如抗体或其片段,与单独的专一抗原或具有优先数量的高度同源抗原(或表位)的相互作用。与之相反,能够特异性结合TREM-1的抗体不能结合不相似的分子。根据本发明的抗体可能不能够结合Nkp44,自然杀伤细胞p44-相关蛋白。

[0111] 相互作用的特异性和平衡结合常数的值可以通过熟知的方法直接确定。评估配体(诸如抗体)结合其靶标的能力的标准测定是本领域已知的,且包括例如,ELISA、蛋白质印迹、RIA和流式细胞术分析。抗体的结合动力学和结合亲和力还可以通过本领域已知的标准测定进行评价,诸如SPR。

[0112] 可以进行竞争性结合测定,其中比较抗体与靶标的结合和所述靶标与另一靶标的配体(诸如另一抗体)的结合。

[0113] 在另一个方面中,本发明提供了组合物和制剂,其包含本发明的分子诸如本文描述的TREM-1抗体、多核苷酸、载体和细胞。例如,本发明提供了包含本发明的一种或多种TREM-1抗体的药物组合物,其与药学上可接受的载体一同配制。

[0114] 因此,本发明的一个目标是提供药物制剂,其包含以0.25 mg/ml至250 mg/ml,的浓度,诸如10至200 mg/ml的浓度存在的TREM-1抗体,且其中所述制剂具有2.0至10.0的pH,诸如4.0至8.0的pH。制剂还可以包含一种或多种缓冲体系、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和/或表面活性剂,以及其各种组合。防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂在药物组合物中的使用是技术人员熟知的。可以参考Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995。

[0115] 在一个实施方案中,所述药物制剂是含水制剂。此类制剂通常是溶液或悬浮液,但也可以包括胶体、分散液、乳液和多相材料。术语“含水制剂”被定义为包含至少50% w/w水的制剂。同样地,术语“含水制剂”被定义为包含至少50% w/w水的溶液,且术语“含水悬浮液”被定义为包含至少50% w/w水的悬浮液。

[0116] 在另一个实施方案中,所述药物制剂是冻干制剂,在使用前医师或患者向其中添加溶剂和/或稀释剂。

[0117] 在另外的方面中,所述药物制剂包含此类抗体的含水溶液和缓冲剂,其中所述抗体以1 mg/ml或以上的浓度存在,且其中所述制剂具有约2.0至约10.0的pH,诸如4.0至8.0的pH。

[0118] 本发明的TREM-1抗体和药物组合物包含这样的抗体,其可以用于治疗诸如以下的炎性疾病:炎症性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)、肠易激综合症、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、一型糖尿病、格雷夫斯病、多发性硬化(MS)、自身免疫性心肌炎、川崎病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺病、自身免疫性甲状腺炎、硬皮病、系统性硬化症、骨关节炎、异位性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病、干燥综合征、自身免疫性肾炎、古德帕斯丘综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、过敏症、哮喘和其它导致急性或慢性炎症的自身免疫疾病。

[0119] 本发明的TREM-1抗体可适用于治疗患有炎症性肠病的个体。炎症性肠病(IBD)是

可以影响嘴至肛门的胃肠道的任何部分的疾病,其导致广泛的各种症状。IBD主要导致腹痛、腹泻(其可以是带血的)、呕吐或体重减少,但也可以导致胃肠道以外的并发症诸如皮疹、关节炎、眼部炎症、疲劳和缺乏注意力。患有IBD的患者可以被分为两个主要类别,患有溃疡性结肠炎(UC)的那些和患有克罗恩病(CD)的那些。CD一般涉及回肠和结肠,其可以影响肠的任何区但是通常是不连续的(疾病的集中区域分布在肠中)。UC通常涉及直肠(结肠的)且更连续。在CD中炎症是透壁的,导致脓肿、瘘管和狭窄,而在UC中炎症通常局限于粘膜。没有已知的用于克罗恩病的药物或手术疗法,而通过手术切除结肠可以治愈一些患有UC的患者。治疗选项受限于控制症状、维持缓解和预防复发。炎症性肠病在临床中的效力可以如用于CD的克罗恩病活性指数(CDAI)分数的减少进行测量,其是基于实验室测试和生活质量调查问卷的得分量表。在动物模型中,功效大多通过体重测量,并且还通过疾病活性指数(DAI)测量,其为粪便硬度、体重和便血的组合。

[0120] 本发明的TREM-1抗体可适用于治疗患有类风湿性关节炎的个体。类风湿性关节炎(RA)是全身性疾病,其影响几乎整个(如果不是全部)身体,且是关节炎最常见的形式。其特征在于关节的炎症,其导致疼痛、僵硬、温热、发红和肿胀。该炎症是炎性细胞入侵关节的结果,并且这些炎性细胞释放可以消化骨和软骨的酶。结果,该炎症可以导致严重的骨和软骨损伤,并且导致关节恶化和严重疼痛,除了其它生理效果之外。波及的关节会失去其形状和排列,导致疼痛和无法运动。

[0121] 本领域已知数种类风湿性关节炎的动物模型。例如,在胶原诱导性关节炎(CIA)模型中,小鼠发展出类似人类风湿性关节炎的炎性关节炎。因为CIA与RA具有相似的免疫学和病理学特征,这使得其成为筛选潜在的人抗炎性化合物的合适的模型。该模型中的功效通过关节肿胀的减少来测量。RA在临床中的功效通过在患者中减少症状的能力来测量,其测量的是关节肿胀、红细胞沉降率、C-反应性蛋白水平和血清因子(诸如抗瓜氨酸化蛋白)水平的组合。

[0122] 本发明的TREM-1抗体可适用于治疗患有银屑病的个体。银屑病是T细胞介导的皮肤的炎性疾病,其可以导致相当大的不适。这是一种目前无法治愈且影响全部年龄的人的疾病。虽然具有轻微银屑病的个体通常可以使用局部药剂控制他们的疾病,但是全世界超过一百万患者需要紫外线治疗或全身免疫抑制疗法。不幸的是,紫外辐射的不便和风险以及很多疗法的毒性限制了它们的长期使用。此外,银屑病患者通常会复发,且在一些情况下在停止免疫抑制疗法后立即出现反弹。近期开发的基于CD4⁺ T细胞转移的银屑病模型模拟了人银屑病的很多方面且因此可以用于鉴定适合用于治疗银屑病的化合物(Davenport 等人, *Internat. Immunopharmacol* 2:653-672, 2002)。通过皮肤病理学的减少使用评分系统来测量在该模型中的功效。相似地,通过皮肤病理学的减少测量在患者中的功效。

[0123] 本发明的TREM-1抗体可适用于治疗患有银屑病关节炎的个体。银屑病关节炎(PA)是发生在一部分银屑病患者中的一类炎性关节炎。在这些患者中,皮肤病理学/症状伴随着与类风湿性关节炎中观察到的类似的关节肿胀。其特征不在于伴随剥落的具有破损的、凸起的、发红的区域的皮肤炎症。银屑病通常影响肘和膝盖尖、头皮、肚脐和生殖器区或肛门周围。大约10%的银屑病患者也发展出其关节的相关炎症。

[0124] 如本文使用的术语“治疗”指的是任何人或其它动物个体所需的医学疗法。预计所述个体已经经历通过医师或兽医师进行的身体检查,其已经得到了初步诊断或最终诊断,

所述诊断指示使用所述治疗有益于所述人或其它动物个体的健康。所述治疗的时间安排和目的可以在个体之间彼此不同,其取决于多种因素,诸如该个体的健康现状。因此,所述治疗可以是预防性的、缓解性的、针对症状的和/或治疗性的。

[0125] 根据本发明,预防性的、缓解性的、针对症状的和/或治疗性的治疗可以代表本发明的不同方面。

[0126] 本发明的抗体可以肠胃外地,诸如静脉内地、诸如肌内地、诸如皮下地施用。可选地,本发明的抗体可以经由非肠胃外途径施用,诸如经口地或局部地。本发明的抗体可以预防性地施用。本发明的抗体可以治疗性地施用(按要求)。

[0127] 在本发明的第一个方面,观察到SEQ ID NO: 3(mAb 0170的可变轻链)的CDR1和CDR3区的带负电残基的取代影响mAb的黏度。在本发明的这第一个方面,本发明的mAb是具有重链和轻链的mAb 0170的变体,其中mAb 0170的轻链,即SEQ ID NO: 3,包含这样的突变,其中SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3的带负电残基被取代为不带电残基。因此,本发明的方面涉及mAb 0170的变体,其包含使用选自以下的氨基酸残基取代SEQ ID NO: 3的残基D1、D30、D33、D74、D98、E27、E97中的任一个或任意组合:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。除非另有说明,本发明的所关注的实施方案涉及抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 2(或其变体)作为重链,且SEQ ID NO: 3的变体作为轻链,其中SEQ ID NO: 3的残基D1、D30、D33、D74、D98、E27、E97的任一个或任意组合被突变为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。这些突变将被称为“电荷补丁”突变。在优选的实施方案中,SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区的E27和E97两者中至少一个被不带电氨基酸残基取代,所述不带电氨基酸诸如选自以下的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。在优选的实施方案中,SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区的E27被突变为谷氨酰胺且E97被选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸取代,更优选地被选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸取代。在另外的实施方案中,E27保持未突变,而E97被突变为选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸,更优选地被突变为选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸。在另一个实施方案中,残基E97保持未突变,而E27被取代为选自甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的氨基酸,更优选地被取代为选自丝氨酸和谷氨酰胺的氨基酸。

[0128] 本发明的另一个方面是基于这样的观察结果:由于配位区域内的相互作用而形成了Fab-Fab二聚体。由于mAb包含两个Fab,预想mAb能够二聚化,所述二聚化可能影响黏度特性。因此,本发明的另一个方面涉及突变SEQ ID NO: 2(即mAb 0170的可变重链区)的Fab-Fab相互作用区中的残基以减少Fab-Fab二聚化。这些突变被称为“Fab-Fab相互作用”突变。因此,本文的方面涉及SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ ID NO 3的F32、D33、Y34、Y53、R54、D98中的任一个残基被取代为选自以下的氨基酸残基:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。除非另有说明,本发明所关注的实施方案涉及一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 2的变体,其中SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ ID NO 3的F32、D33、Y34、Y53、R54、D98中的任一个残基(“Fab-Fab相互作用”突变)被另一种氨基酸取代,所述另一种氨基酸是诸如天然氨基酸,优选地选自以下的氨基

酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。优选地，SEQ ID NO 2的残基A59和N57中至少一个被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸；更优选丝氨酸或酪氨酸。在一个实施方案中，A59保持未突变而N57被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸；更优选丝氨酸或酪氨酸。在另一个实施方案中，N57保持未突变而A59被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸。在至少一种实施方案中，A59和N57两者均被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸；更优选丝氨酸或酪氨酸。

[0129] 在一个所关注的实施方案中，i) SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3区的至少一个带负电残基被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸，且ii) SEQ ID NO: 2的Y32、R52、S55、S56、N57、A59、M102、I104和R106或SEQ ID NO: 3的F32、D33、Y34、Y53、R54、D98残基中的至少一个残基(“Fab-Fab相互作用”突变)被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸和色氨酸、组氨酸和酪氨酸。

[0130] 在合适的实施方案中，SEQ ID NO: 3的E27和E97之一或两者被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸，而SEQ ID NO: 2的A59和N57之一或两者被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸；更优选丝氨酸或酪氨酸。

[0131] 本发明另外的方面是基于这样的观察结果：在TREM-1的SEQ ID NO 1的位置Y90上的Ala取代改善了SEQ ID NO 3对TREM-1的亲合力。据发现，Y90与SEQ ID NO 3的苯丙氨酸残基相互作用。为了改善Fab-TREM-1相互作用的SEQ ID NO: 3的突变被称为Fab-TREM-1相互作用突变。在本发明的该方面的一个实施方案中，SEQ ID NO: 3的位置32的苯丙氨酸被突变为选自以下的氨基酸残基：甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸，优选地选自丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸和亮氨酸。在所关注的实施方案中，SEQ ID NO: 3的F32被突变为丙氨酸或丝氨酸。

[0132] SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3中的电荷补丁突变降低了流体动力学半径(Rh)而Fab-Fab相互作用区中的突变增加了Rh(图6)。“Fab-TREM-1相互作用”位点中的突变不影响Rh且对黏度影响甚微(图6和1，表3C和3E)。

		包含序列ID号	SEQ ID NO: 2或3的突变	链
电荷补丁突变	0317	SEQ ID NO: 4和2	E27Q, E97S	L
	0318	SEQ ID NO: 5和2	E27Q, E97Q	L
	0319	SEQ ID NO: 6和2	E97S	L
	0320	SEQ ID NO: 7和2	E97Q	L
	0321	SEQ ID NO: 8和2	E27Q	L
Fab-Fab相互作用突变	0324	SEQ ID NO: 11和3	A59Y	H
	0325	SEQ ID NO: 12和3	N57S	H
	0326	SEQ ID NO: 13和3	A59Y, N57S	H
Fab-TREM-1相互作用突变	0322	SEQ ID NO: 9和2	F32A	L
	0323	SEQ ID NO: 10和2	F32S	L
电荷补丁和Fab-TREM-1相互作用突变	0330	SEQ ID NO: 14和2	F32A, E27Q, E97Q	L
电荷补丁和Fab-Fab相互作用突变	0332	SEQ ID NO: 15和5	A59Y/E27Q, E97Q	H/L
电荷补丁、Fab-TREM-1相互作用和Fab-Fab相互作用	0333	SEQ ID NO: 14和16	A59Y/F32A, E27Q, E97Q	H/L

表 1生成的SEQ ID No (0170) mAb变体的概述。L =轻链, H =重链。

[0133] 通过DLS或微观流变学确定了mAb 0170变体的黏度,并且显示“电荷补丁”突变和“Fab-Fab相互作用”突变降低了黏度。据发现,包含电荷补丁突变E27Q和E97Q的mAb变体0318具有最低黏度。

[0134] 分别确定了mAb 0170变体对人TREM-1-Fc和食蟹猴TREM-1-Fc的结合动力学。发现所有mAb 0170变体对人TREM-1-Fc均具有相似的亲和力。有趣的是,据发现,mAb变体SEQ ID NO: 9(其包括“Fab-TREM-1相互作用”突变)对食蟹猴TREM-1-Fc具有增加的亲和力(表2)。

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

表2:抗-TREM-1 mAb变体分别对人TREM-1-Fc和食蟹猴TREM-1-Fc的亲和力。

[0135] 在一个实施方案中,将来自SEQ ID NO: 9的突变与SEQ ID NO: 5的突变组合以生成来自SEQ ID NO: 14的轻链,并且将来自SEQ ID NO: 14的轻链的突变进一步与来自SEQ ID NO: 16的重链组合,得到对TREM-1改善的亲和力以及低黏度。包含SEQ ID NO: 14的组合突变的mAb变体保留了对TREM-1-Fc增加的亲和力,且所述突变对人TREM-1-Fc的亲和力没有负面影响。因此,本发明设想了:同时包含“电荷补丁”突变和“Fab-TREM-1相互作用”突变的实施方案,以及同时包含“电荷补丁”突变和“Fab-Fab相互作用”突变的实施方案,以及同时包含“Fab-Fab相互作用”突变和“Fab-TREM-1相互作用”突变的实施方案以及同时包含“Fab-Fab相互作用”突变、“Fab-TREM-1相互作用”突变和“电荷补丁”突变的实施方案。

0170		0317		0318	
蛋白浓度(mg/mL)	黏度(cP)	蛋白浓度(mg/mL)	黏度(cP)	蛋白浓度(mg/mL)	黏度(cP)
100.0	26.0	85.0	2.9	85.0	1.9
80.0	14.5	63.8	2.2	63.8	1.9
60.0	6.0	42.5	1.9	42.5	2.0
40.0	3.1	17.0	1.3	17.0	1.2
20.0	1.6	10.2	1.2	10.2	1.2
12.0	1.3	3.4	1.1	3.4	1.2
4.0	1.1	0.0	1.0	0.0	1.0
0.0	0.9				

表3A:mAb 0170、0317和0318的黏度对蛋白浓度。

0319		0320		0321	
蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)
85.0	2.2	107.0	7.8	106.0	5.9
63.8	2.3	80.3	3.7	79.5	3.0
42.5	2.0	53.5	2.5	53.0	2.0
17.0	1.2	26.8	1.6	26.5	1.6
10.2	1.1	13.4	1.3	13.3	1.2
3.4	1.1	6.7	1.2	6.6	1.1
0.0	1.0	3.3	1.1	3.3	1.1
		0.0	1.0	0.0	0.9

表3B:mAb 0319和0320和321的黏度对蛋白浓度。

0322		0323		0324	
蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)
100.0	16.4	101.0	21.3	103.0	5.4
75.0	4.9	75.8	11.3	77.3	3.1
50.0	3.3	50.5	3.7	51.5	2.2
25.0	2.0	25.3	2.6	25.8	1.6
12.5	1.6	12.6	2.0	12.9	1.4
6.3	1.4	6.3	1.4	6.4	1.3
3.1	1.3	3.2	1.2	3.2	1.2
0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.9

表3C:mAb 0322、0323和324的黏度对蛋白浓度。

0325		0326		0330	
蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/ml)	黏度 (cP)
95.0	7.8	109.0	7.5	104.5	3.8
71.3	3.7	81.8	3.1	50.5	2.1
47.5	2.3	54.5	2.2	23.9	1.4
23.8	1.6	27.3	1.6	9.4	1.3
11.9	1.3	6.8	1.5	4.7	1.1
5.9	1.3	3.4	1.1	1.9	1.1
3.0	1.2	0.0	0.9	1.0	1.3
0.0	1.0				

表3D:mAb 0325、0326和0330的黏度对蛋白浓度。

0332		0333	
蛋白浓度 (mg/mL)	黏度 (cP)	蛋白浓度 (mg/mL)	黏度 (cP)
114.1	5.9	113.2	5.2
53.6	2.1	47.1	2.1
22.2	2.2	24.9	2.0
9.0	2.2	9.0	1.8
4.6	1.8	4.5	1.5
1.9	1.2	1.8	1.6
1.1	1.1	0.9	1.4

表3E mAb 0322和0333的黏度对蛋白浓度。

[0136] 本发明的非限制性实施方案还包括：

1. 能够结合并阻断SEQ ID NO: 1的TREM-1的抗体或其片段，其特征在于所述抗体或所述抗体的抗体片段在50 mg/mL的浓度下具有小于5 cP，诸如小于4 cP，优选地小于3 cP的黏度（其中测定相对于蛋白质浓度条件的黏度的方法是常规的或如本文所述）。

[0137] 2. 能够结合并阻断TREM-1的抗体或其片段，其特征在于所述抗体或所述抗体的抗体片段在80 mg/mL的浓度下具有小于5 cP，优选地小于4 cP的黏度（其中测定相对于蛋白质浓度条件的黏度的方法是常规的或如本文所述）。

[0138] 3. 根据实施方案1或2的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段以小于0.5 nM，诸如小于0.4 nM，优选地0.3 nM或更小的针对SEQ ID NO: 1的KD阻断TREM-1功能。

[0139] 4. 一种抗体或其片段，其中所述抗体或其片段与mAb 0170竞争结合至SEQ ID NO: 1，并且具有如下黏度概况：

(A) 所述抗体或所述抗体的抗体片段在50 mg/mL的浓度下具有小于5 cP，诸如小于4 cP，优选地小于3 cP的黏度；或

(B) 所述抗体或所述抗体的抗体片段在80 mg/mL的浓度下具有小于5 cP，优选地小于4 cP的黏度。

[0140] 5. 一种抗体或其片段，其能够特异性结合并阻断TREM-1，其中所述抗体或其片段具有SEQ ID NO: 2的“Fab-Fab相互作用”突变。

[0141] 6. 一种抗体或其片段，其能够特异性结合并阻断SEQ ID NO: 1的TREM-1，其中所述抗体或其片段具有“电荷补丁”突变，诸如其中SEQ ID NO: 3的CDR1和CDR3的带负电残基中的至少一个被未带电残基取代。

[0142] 7. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段，其中带负电氨基酸被能够形成氢键配偶体的氨基酸残基取代，诸如Asp或Glu残基被突变为Asn、Gln、Ser和Thr中任一种。

[0143] 8. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段，其具有相比mAb 0170更低的黏度，但是仍具有小于0.5 nM的针对SEQ ID NO: 1的 K_D 。

[0144] 9. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段，其通过取代SEQ ID NO: 2和/或3的未带电氨基酸（其涉及与具有改变的大小或氢键电势的氨基酸的特异性“Fab-Fab相互作用”）而具有相比mAb 0170降低的黏度、小于0.5 nM的针对SEQ ID NO: 1的 K_D 和小于0.6 nM的针对SEQ ID NO: 17的 K_D 。

[0145] 10. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段,其能够特异性地结合并阻断 SEQ ID NO: 1的TREM-1并且包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的变体或两者,其中所述变体选自SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的“Fab-Fab相互作用”突变、“Fab-TREM-1相互作用”突变和“电荷-补丁”突变。

[0146] 11. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段,其包含“Fab-TREM-1相互作用”突变,诸如其中SEQ ID NO: 3的一个Phe残基被取代为Ala或Ser。

[0147] 12. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段,其与SEQ ID NO: 2或3竞争结合SEQ ID NO: 1,并且其具有这样的表位,所述表位包含氨基酸残基D38、V39、K40、C41、D42、Y43、T44和L45中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部以及SEQ ID NO: 1的氨基酸残基E46、K47、F48中一个、两个或全部。

[0148] 13. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段,其与SEQ ID NO: 3竞争结合,并且其包含这样的LC,所述LC中SEQ ID NO: 3的位置29和97的谷氨酸(E)残基中的一个或两个被突变为丝氨酸(S)或谷氨酰胺(Q),诸如其中E27Q、E97S,诸如其中E27和E97被突变为谷氨酰胺或其中E27保持未突变而E97被突变为S(E27, E97S),或其中E27保持未突变而E97被突变为Q(E27, E97Q),或其中E97保持未突变而E27被突变为Q或S,更优选地突变为Q(E27, E97Q)。

[0149] 14. 根据本发明的任意实施方案的抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 3,其中位置32的苯丙氨酸(F32)被突变,诸如突变为A(mAb 0322)或S(mAb 0323)。

[0150] 15. 根据任意实施方案的抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 2,其中残基N57和残基A59中的一个或两个已被突变,诸如其中A59已被突变为酪氨酸,或其中残基N57已经被突变为丝氨酸,或其中残基N57已经被突变为丝氨酸且A59已被突变为酪氨酸。

[0151] 16. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 2的变体,其中涉及特异性Fab-Fab相互作用的不带电氨基酸被具有改变的大小或氢键电势的氨基酸取代,诸如其中丙氨酸(A)或天冬氨酸(N)被Ser、Thr、Phe、Tyr和Trp中任一种取代。

[0152] 17. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 3的变体且与SEQ ID NO: 3竞争结合,其中SEQ ID NO: 3的位置29和97的谷氨酸(E)残基中的一个或两个被突变为丝氨酸(S)或谷氨酰胺(Q),诸如其中E27、E97两者均被突变为谷氨酰胺(318),或其中E27保持未突变而E97被突变为S(E27, E97S),或其中E27保持未突变而E97被突变为Q(E27, E97Q),或其中E97保持未突变而E27被突变为Q或S,更优选地突变为Q(E27, E97Q)。

[0153] 18. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 2的变体且与SEQ ID NO: 2竞争结合,其中残基N57和残基A59中的一个或两个已被突变,诸如其中A59已被突变为酪氨酸,或其中残基N57已经被突变为丝氨酸,或其中残基N57已经被突变为丝氨酸且A59已被突变为酪氨酸。

[0154] 19. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 4。

[0155] 20. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 5。

[0156] 21. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 6。

[0157] 22. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 7。

[0158] 23. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 8。

[0159] 24. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 9。

- [0160] 25. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 10。
- [0161] 26. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 11。
- [0162] 27. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 12。
- [0163] 28. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 13。
- [0164] 29. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 14。
- [0165] 30. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 15。
- [0166] 31. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO: 16。
- [0167] 32. 一种抗体或其片段,其包含SEQ ID NO:4至16中的任一者。
- [0168] 33. 一种组合物,其包含如实施方案1-32中任一项定义的抗体。
- [0169] 34. 本发明的诸如实施方案1-32的抗体,用作药物。
- [0170] 35. 本发明的诸如实施方案1-32的抗体,用于治疗选自炎性疾病或自身免疫疾病的疾病。
- [0171] 36. 根据实施方案35的抗体,其中所述疾病选自类风湿性关节炎和炎症性肠病。
- [0172] 37. 本发明的诸如实施方案1-32的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗选自炎性疾病或自身免疫疾病的疾病。
- [0173] 38. 根据实施方案35的用途,其中所述疾病选自类风湿性关节炎和炎症性肠病。
- [0174] 39. 治疗选自炎性疾病或自身免疫疾病的疾病的方法,其包括施用本发明的抗体(诸如实施方案1-32中任一项的抗体)、包含本发明的抗体的组合物或包含本发明的抗体的药物。

实施例

[0175] 实施例1:mAb0170 变体的流体动力学半径和黏度

据发现,W02013/120553的mAb0170的流体动力学半径比期望的(5-6 nm)更高(9-10 nm)。通过使用DynaPro平板读取器(Wyatt Inc.)设置的96孔板的动态光散射分析确定流体动力学半径。使用的板为Corning 3540分析平板(Corning)。对于mAb0170变体,总样品体积为大约20μL且温度保持在25 °C(图6)。

[0176] 可变轻链的CDR1和CDR3中的电荷补丁突变将Rh降低至单体mAb的期望水平,而Fab-Fab相互作用区中的突变似乎增加了Rh。Fab-TREM-1相互作用位点中的突变没有影响Rh。

[0177] 通过DLS确定mAb0170变体0317、0318、0319、0320、0321、0322、0323、0324、0325、0326和0330的黏度。Wyatt DynaPro平板读取器上使用Corning 3540底部透明、黑色未处理的聚苯乙烯微孔板和来自Phosphorex Inc.的具有平均直径206.5 nm光滑的聚苯乙烯纳米球(目录号106)测量流体动力学半径。将蛋白样品转移至Corning 3540平板中并使用顶部密封覆盖。将样品离心并且在Wyatt DynaPro DLS平板读取器上测量蛋白样品的流体动力学半径。向每孔添加0.5μL聚苯乙烯小珠并抽吸混合。将样品再次离心并且在Wyatt DynaPro DLS平板读取器上测量蛋白样品的流体动力学半径。

[0178] 蛋白样品的黏度按以下计算:

黏度(蛋白) = (流体动力学半径(小珠,测量的) × 黏度(缓冲液)) / 流体动力学半径(小珠,真实)

其中黏度(蛋白)是计算的蛋白溶液的黏度,流体动力学半径(小珠,测量的)是在蛋白溶液中测量的聚苯乙烯小珠的流体动力学半径,黏度(缓冲液)是缓冲液的黏度且流体动力学半径(小珠,真实)是小珠的真实平均直径(He 等人, Anal Biochem, 399, 141-143, 2010)。

[0179] 通过微观流变学确定mAb0170变体0332和0333的黏度。对于流变学分析,使用附接有30G Novofine针的250 μ l Hamilton LT注射器(Hamilton-Bonaduz Inc)。将注射器置于固定于平台上的定制的铝架。通过TAXTPlus Texture Analyzer驱动注射器的活塞,其通过预定的注射速度测量活塞上所得的力。使用三种不同注射速度测试各个样品。使用交叉速度和测量的力分别计算剪切速率和剪切力。黏度可以与剪切速率的关系表示:

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

其中 $\eta_{\text{蛋白}}$ 是蛋白溶液的黏度, γ 是表面剪切速率, τ_w 是剪切力,P是驱动活塞产生的压力,Q是流体穿过毛细管针头的容积流率,且D和L分别是毛细管的直径和长度(Allahham 等人, 2004; Intl J Pharm 270, 139-148)。黏度 $\eta_{\text{蛋白}}$ 通过D、L和Q的已知值和测量的P值计算。

[0180] 分析显示,“电荷补丁”突变和“Fab-Fab相互作用”突变均降低黏度(图1)。据发现,包含电荷补丁突变E27Q和E97Q的mAb变体SEQ ID NO: 5具有最低黏度。

[0181] 实施例2:mAb0170 变体动力学

分别确定mAb 0170变体对人TREM-1-Fc和食蟹猴TREM-1-Fc的结合动力学。在ProteOn Analyzer (BioRad)上执行结合研究,其通过表面等离子体共振实时测量分子相互作用。实验在25°C运行且样品在15 °C贮存于样品室。由ProteOn报道的信号(RU,反应单位)与六个平行流通池中的独立传感芯片表面上的质量直接相关。根据制造商说明书,将来自Biacore人或小鼠Fc捕获试剂盒的抗人Fc单克隆或抗鼠Fc多克隆抗体以水平方向固定于GLM传感芯片的流通池上。在每个实验中捕获抗体的最终固定水平为大约2600-6000 RU。纯化的单克隆小鼠或重组表达的抗-hTREM-1抗体的捕获通过以下来进行:将抗体在电泳缓冲液(10 mM Hepes 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% 表面活性剂P20, pH 7.4)中稀释至5-10 nM,随后在30 μ L/min以垂直方向注射60 sec,产生仅具有固定的抗-Fc抗体的临近全部流通池的参考交叉点。这通常导致大约100-300 RU的测试抗体的最终捕获水平和30-90 RU的分析物Rmax值。通过在水平方向对全部流通池注射分析物(抗原)进行hTREM-1或cTREM-1蛋白的结合,以允许对不同的捕获的抗-TREM-1抗体的结合与对参考交叉点的结合进行比较性分析。hTREM-1或cTREM-1蛋白经1:3或1.2-100 nM系列稀释或进入电泳缓冲液,以100 μ L/min注射250s并允许解离600s。在分析物的每个注射周期后经由10 mM 甘氨酸,pH 1.7和50 mM NaOH在100 μ L/min的两次18 s注射后再生GLM表面。该再生步骤将抗-TREM-1抗体和任何结合TREM-1蛋白从固定的捕获抗体表面移除,并且允许接下来的相互作用样品对的后续结合。再生程序不能直接移除芯片表面的固定的抗-Fc捕获抗体。

[0182] 抗体和抗原之间的结合亲和力通过确定由复合物形成和解离的动力学的测量结果所确定的平衡解离常数 (K_D) 来进行定量。使用ProteOn评估软件用于数据分析,通过拟合数据至1:1Langmuir模型检索对应于单价复合物的结合和解离的速率常数诸如 k_a (结合常数)和 k_d (解离常数)。 K_D 通过方程式 $K_D = k_d / k_a$ 而与 k_a 和 k_d 关联。

[0183] 在数据分析前通过双重参考(减去参考表面信号以及对捕获的抗-TREM-1抗体的

空白缓冲液注射)处理结合曲线。这允许修正样品注射期间的设备噪音、体积偏移和漂移。

[0184] 据发现,所有mAb 0170变体均具有与mAb 0170对人TREM-1-Fc的相似的亲和力。有趣的是,包含“Fab-TREM-1相互作用”的mAb变体,诸如mAb 0322,对食蟹猴TREM-1-Fc具有增加的亲和力(表2)。

[0185] 实施例3:mAb 0330和mAb 0333的动力学和黏度

为了生成对食蟹猴TREM-1具有改善的亲和力并具有低黏度的mAb,将SEQ ID NO 9的突变与SEQ ID NO 5的突变组合,发现其具有mAb0170变体中最低的黏度,而与SEQ ID NO: 11组合,发现其对黏度影响有限。包含组合突变的mAb变体(mAb 0330和mAb 0333)保留了对TREM-1-Fc增加的亲和力,且所述突变没有影响对人TREM-1-Fc亲和力。相比W02013/120553中的mAb 0170,mAb 0330和mAb 0333的黏度显著降低。

[0186] 实施例4:BWZ' 36/hTREM-1稳定细胞系的培养

在补充有10% FCS (Cat# 16140-071, Gibco, New York, USA), 1% Pen/Strep (Cat# 15070-06, Gibco), 1 mM 丙酮酸钠 (Cat #11360, Gibco), 5 μ M -2ME (Cat# 31350-010, Gibco)和2 mM L-谷氨酰胺 (Cat # 25030, Gibco)的RPMI 1640 w/o酚红 ((Cat# 11835, Gibco, Carlsbad CA, USA))中培养BWZ' 36/hTREM-1报道细胞。不需要特定的板或包覆。添加10 ml Versene (Cat # 15040, Gibco)以分离细胞,随后将其转移至管中,以1200 rpm离心5分钟并在新鲜RPMI 1640 w/o酚红中洗涤。这些细胞随后可用于测定或进一步增殖的再培养。

[0187] 实施例5:mAb 0170变体的功能特征

使用由Bioxell提供的报道细胞系(BWZ' 36/hTREM-1)确定抗-TREM-1 mAb 0170变体对人TREM-1信号传导的抑制能力。使用重组蛋白形式的或在与mAb温育前由活化的嗜中性粒细胞表达的PGN和TREM-1配体PGLYRP1刺激报道细胞系。据发现,变体抑制TREM-1信号通路的效力是临床相关的并且等同于 W02013/120553的mAb 0170(图2A和B)。

[0188] 类似地,确定了三种具有最低黏度的mAb0170变体的抑制食蟹猴TREM-1信号通路的能力,并且两种变体观察到对食蟹猴TREM-1具有增加的亲和力。在使用成熟的报道细胞系TE 426.27的该测定中,观察到了mAb变体与W02013/120553的mAb 0170相似的效力(图3)。

[0189] 而且,评价了mAb变体阻断来自健康供体的原代细胞释放TNFa的效力。在该测定中,在低氧条件下将单核细胞分化成M2巨噬细胞以增加TREM-1表达,且在与mAb温育前使用PGN和重组PGLYRP1活化。据发现,mAb变体在抑制TREM-1介导的从低氧M2巨噬细胞释放TNFa中具有与0170一样的效力。

[0190] 实施例6:Fab 0170-Fab 0170复合物的晶体结构

通过Fab 0170-Fab 0170晶体结构的结晶分析评估mAb 0170分子通过特定的自我相互作用进行相互作用的潜力。

[0191] 材料:在由10 mM 磷酸盐、2.68 mM KCl、140 mM NaCl在pH 7.4下组成的缓冲液中在蛋白浓度8.5 mg/mL的mAb 0170 (SEQ ID NO: 18和SEQ ID NO: 19)的Fab区。

[0192] 方法:mAb 0170的Fab区在悬滴蒸汽扩散实验中通过2 μ L蛋白溶液与2 μ L储存溶液混合的液滴和0.5 mL由20% (w/v) PEG 8000, 200 mM K_2HPO_4 构成的储存液的平衡结晶化。将晶体转移至由2 μ L 35% (w/v) PEG3350, 200 mM K_2HPO_4 组成的液滴,并且固定在

0.2 mm直径的litholoop(Molecular Dimensions Limited)中并且在液氮中迅速冷却。

[0193] 在MAXLAB 911-2, Lund University, Sweden上在100 K使用低温流收集X-射线衍射数据。使用XDS数据包(Kabsch, Acta Crystallogr. D66, 133-144 (2010))将原始数据索引、生成并测量。晶体的空间组为P2 (1) 2 (1) 2 (1), 具有单位晶胞参数 $a = 62.4 \text{ \AA}$, $b = 110.9 \text{ \AA}$, $c = 158.4 \text{ \AA}$ 。收集2.40 $\text{\AA}$ 分辨率的数据。使用应用CCP4i程序组(Potterton 等人, Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003))的Phenix软件通过分子取代解析结构(Adams 等人, Acta Crystallogr. D66, 213—221 (2010))。检索模型是来自pdb入口1AD0.pdb (85%同一性)的重链和来自pdb入口2QRG (94%同一性)的轻链的结构。使用来自CCP4i程序组的Refmac5实施结构精修(Murshudov 等人, Acta Crystallogr. D53, 240-255 (1997))。使用Coot版本7(Emsley 等人, Acta Crystallogr. D66, 486-501 (2010))用于手动结构重建和验证。

[0194] 结果与讨论

mAb 170 Fab区的晶体结构在不对称单元中含有四个Fab分子(重链被标记为A和C, 轻链被标记为B和D)。Fab分子被包装为二聚体, 其中一个Fab分子的抗原结合区与另一个Fab分子的抗原结合区相互作用。晶体结构中不可能包括并改善SEQ ID NO: 19的最后的半胱氨酸, 尽管其预期与来自重链的SEQ ID NO: 18的Cys以二硫键相连。在该范围存在一些超2Fo-Fc和Fo-Fc电子密度的指示, 且可能在Fab分子的子集中存在二硫键。对来自不对称单元中SEQ ID NO: 18的链A的残基G26、K78-N79、I104-R105和S138-E141和对于不对称单元中的SEQ ID NO: 18其它Fab分子中链C的E1、G26-F 27、M102-R105、S136-E141、S195-K200没有显著的sigmaa加权2Fo-Fc电子密度。同样对来自SEQ ID NO: 19链D的残基D30-Y34失去显著的sigmaa加权2Fo-Fc电子密度。这些残基不包括在晶体结构中, 但是通过与W02013/120553公开的人抗-TREM-1 mAb 0170晶体结构的mAb 0170片段晶体结构叠加而被包括在Fab-Fab交界面的分子相互作用分析中。

[0195] mAb 0170 Fab片段结构的质量参数显示结构的总R-因子= 24%且Free R-factor = 30%。总相关系数为0.93且衍射组分精度指数, DPI=0.3 $\text{\AA}$ (Cruickshank, Acta Crystallogr. D55, 583-601 (1999))。结构中的键长与理想键长的均方根偏差= 0.025 $\text{\AA}$ 且与理想键角度的均方根偏差=2.326° (Engh and Huber, Acta Crystallogr. A47, 392-400 (1991))。

[0196] 使用CCP4程序组中的程序NCONT, 以分子间距离4 $\text{\AA}$ 的截止实施分子间距离的分析(Potterton 等人, Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003)) (表4)。分析显示, 来自SEQ ID NO: 2的氨基酸残基N57和A59属于涉及晶体结构中Fab-Fab相互作用的那类氨基酸。

		靶标氨基酸, Fab 2 (Chain C和D)	
F32	SEQ ID N03	Y32	SEQ ID N02
F32	SEQ ID N03	M102	SEQ ID N02
D33	SEQ ID N03	Y53	SEQ ID N03
Y34	SEQ ID N03	Y34	SEQ ID N03
Y34	SEQ ID N03	R54	SEQ ID N03
D98	SEQ ID N03	S55	SEQ ID N02
R52	SEQ ID N02	S55	SEQ ID N02
R52	SEQ ID N02	S56	SEQ ID N02
S55	SEQ ID N02	A59	SEQ ID N02
S55	SEQ ID N02	R52	SEQ ID N02
S56	SEQ ID N02	S56	SEQ ID N02
N57	SEQ ID N02	S56	SEQ ID N02
N57	SEQ ID N02	N57	SEQ ID N02
N57	SEQ ID N02	A59	SEQ ID N02
A59	SEQ ID N02	S55	SEQ ID N02
A59	SEQ ID N02	S56	SEQ ID N02
A59	SEQ ID N02	N57	SEQ ID N02
I104	SEQ ID N02	I104	SEQ ID N02
I104	SEQ ID N02	R106	SEQ ID N02
R106	SEQ ID N02	F32	SEQ ID N03

表4. 基于W02013/120553公开的人源化抗-TREM-1 mAb 0170晶体结构与在此观察到的mAb 0170 Fab区晶体结构的叠加而预测的Fab-Fab相互作用。

序列表

<110> 诺和诺德股份有限公司Novo Nordisk A/S

<120> 定点诱变TREM-1抗体以降低黏度

<130> P45251W0-PJG

<150> EP14177547.8

<151> 2014-07-17

<150> EP14194893.5

<151> 2014-11-26

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1           5           10           15
Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
          20           25           30
Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
          35           40           45
Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
          50           55           60
Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
65           70           75           80
Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
          85           90           95
Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
          100          105          110
Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
          115          120          125
Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
          130          135          140
Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
145          150          155          160
Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
          165          170          175
Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu

```

	180		185		190
Thr Asn Val	Thr Asp Ile Ile Arg Val	Pro Val Phe Asn Ile Val Ile			
195		200		205	
Leu Leu Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu					
210		215		220	
Phe Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Val Pro					
225		230			
<210>	2				
<211>	448				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人源化TREM-1抗体重链				
<400>	2				
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1	5		10		15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr					
20		25		30	
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
35		40		45	
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala					
50		55		60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr					
65		70		75	
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr					
85		90		95	
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly					
100		105		110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser					
115		120		125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala					
130		135		140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val					
145		150		155	
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala					
165		170		175	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val					
180		185		190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His					

195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445

<210> 3

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 链

<222> (1) .. (218)

<223> 人源化TREM-1抗体轻链

<400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化TREM-1抗体轻链

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe

20	25	30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85	90	95
Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65	70	75	80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn			
	85	90	95
Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
	100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
	115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
	130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
145	150	155	160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
	165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
	180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
	195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210	215	
<210> 6			
<211> 218			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人源化TREM-1抗体轻链			
<400> 6			
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe			
	20	25	30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn			
	85	90	95
Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			

		100						105						110						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln					
		115						120						125						
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr					
		130						135						140						
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser					
145						150						155						160		
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr					
				165						170						175				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys					
				180						185						190				
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro					
		195						200						205						
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
		210						215												
<210>	7																			
<211>	218																			
<212>	PRT																			
<213>	人工序列																			
<220>																				
<223>	人源化TREM-1抗体轻链																			
<400>	7																			
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly					
1				5					10					15						
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Phe					
			20						25						30					
Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro					
		35						40						45						
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp					
		50						55						60						
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser					
65				70						75						80				
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn					
			85						90						95					
Gln	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
		100						105						110						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln					
		115						120						125						
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr					

130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 8		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化TREM-1抗体轻链		
<400> 8		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe		
20	25	30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85	90	95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		

	165		170		175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	180		185		190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					
	195		200		205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210		215		
<210> 9					
<211> 218					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人源化TREM-1抗体轻链					
<400> 9					
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ala					
	20		25		30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro					
	35		40		45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp					
	50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
65	70		75		80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn					
	85		90		95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg					
	100		105		110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln					
	115		120		125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr					
	130		135		140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser					
145	150		155		160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	165		170		175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	180		185		190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					

195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 10		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化TREM-1抗体轻链		
<400> 10		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser		
20 25 30		
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35 40 45		
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
50 55 60		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65 70 75 80		
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85 90 95		
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100 105 110		
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
115 120 125		
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130 135 140		
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145 150 155 160		
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
165 170 175		
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
180 185 190		
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195 200 205		
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210 215		
<210> 11		

<211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化TREM-1抗体重链
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 12		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化TREM-1抗体重链		
<400> 12		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		

65	70	75	80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445
<210>	13		
<211>	448		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人源化TREM-1抗体重链		
<400>	13		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr			
	20	25	30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Ser Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala			
	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
65	70	75	80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210>	14	
<211>	218	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人源化TREM-1抗体轻链	
<400>	14	

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Thr	Ala
			20					25					30		
Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
	35						40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70				75					80	
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
				85					90					95	
Gln	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105					110		
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
			115				120						125		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130					135					140				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155				160	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210						215								

<210> 15

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化TREM-1抗体重链

<400> 15

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
80		
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
160		
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
240		
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
320		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		

340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 16		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人源化TREM-1抗体重链		
<400> 16		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
20 25 30		
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala		
50 55 60		
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65 70 75 80		
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85 90 95		
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly		
100 105 110		
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115 120 125		
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
130 135 140		
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445
<210> 17			
<211> 233			

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 17

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15
Glu Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys
20 25 30
Glu Gly Gln Thr Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr
35 40 45
Ala Asn Ser Arg Lys Ala Trp Gln Lys Met Glu Gly Lys Met Pro Lys
50 55 60
Ile Leu Ala Lys Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln
65 70 75 80
Val Gly Arg Ile Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln
85 90 95
Val Gln Met Thr Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
100 105 110
Val Ile Tyr Gln His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile
115 120 125
Cys Leu Val Val Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu
130 135 140
Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala
145 150 155 160
Leu Gly Pro Arg Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro
165 170 175
Glu Ser Thr Val Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr
180 185 190
Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile Ile
195 200 205
Val Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Phe
210 215 220
Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Gly Pro
225 230

<210> 18

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于结晶化的表达构建体

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215

<210> 19

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于结晶化的表达构建体

<400> 19

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe

20							25						30					
Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro			
35							40						45					
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp			
50							55						60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser			
65							70						75					
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn			
85							90						95					
Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg			
100							105						110					
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln			
115							120						125					
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr			
130							135						140					
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser			
145							150						155					
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr			
165							170						175					
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys			
180							185						190					
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro			
195							200						205					
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
210							215											

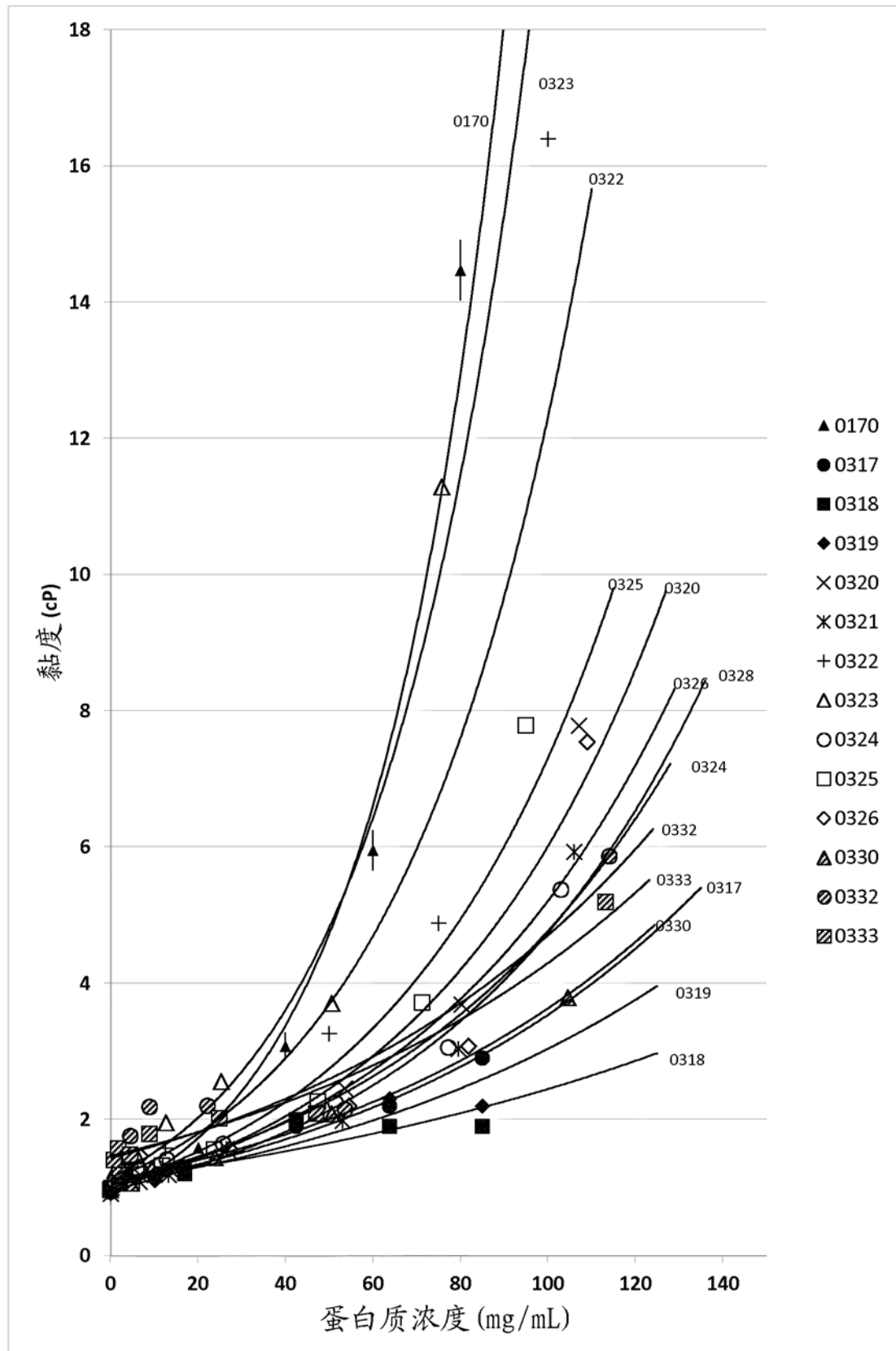


图 1

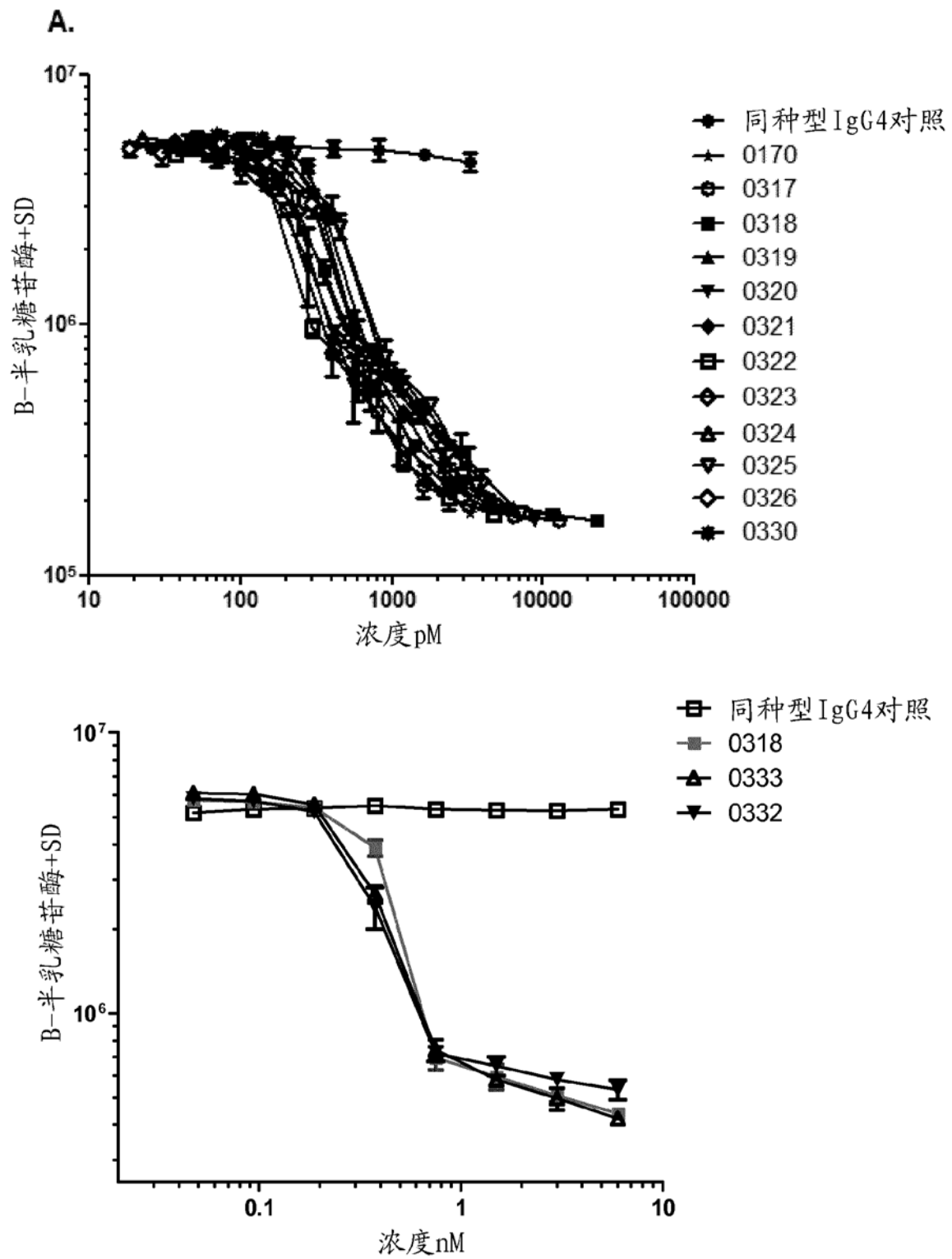
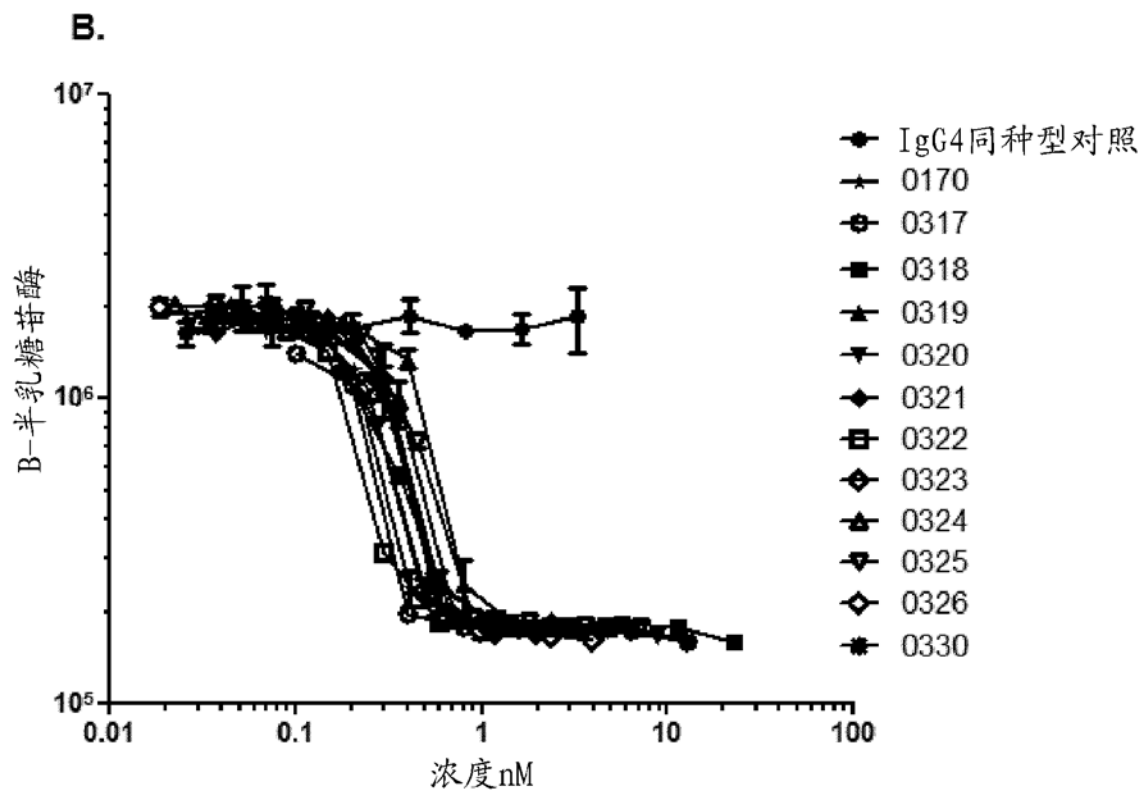


图 2

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

图 2A



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

图 2B

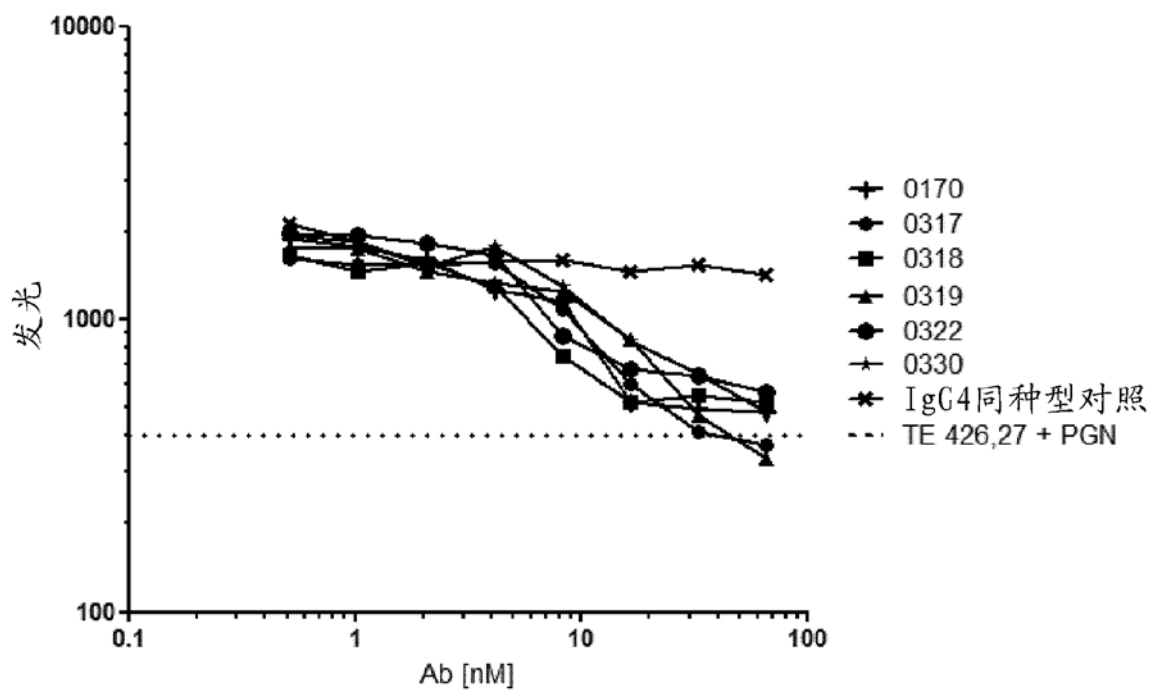


图 3

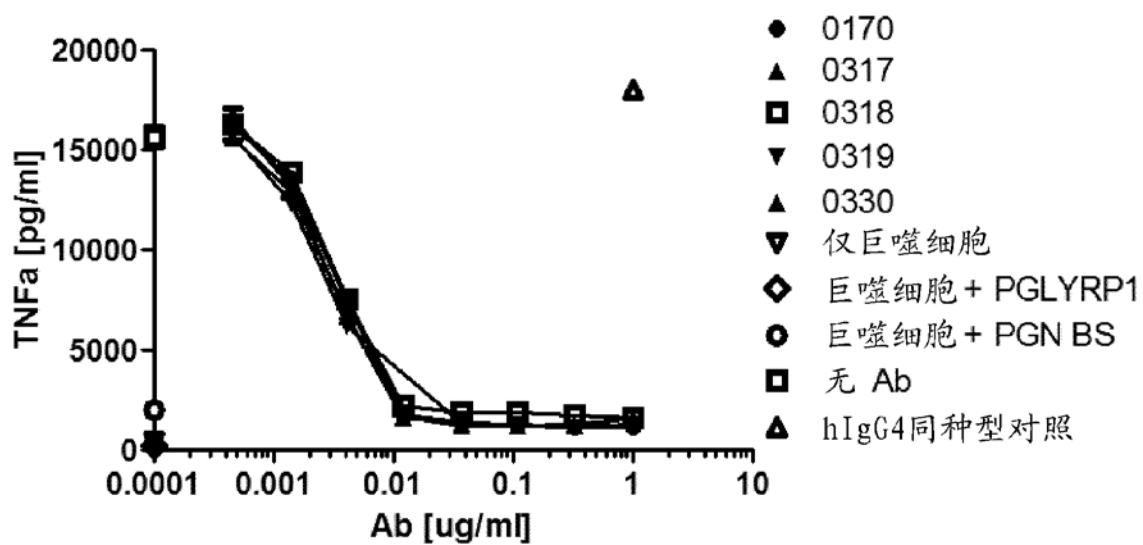


图 4

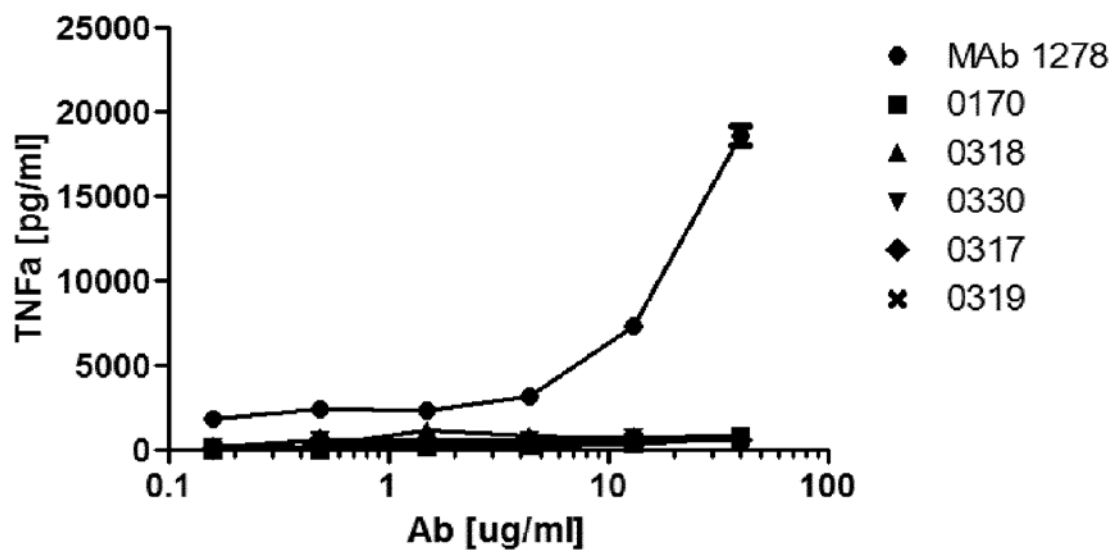


图 5

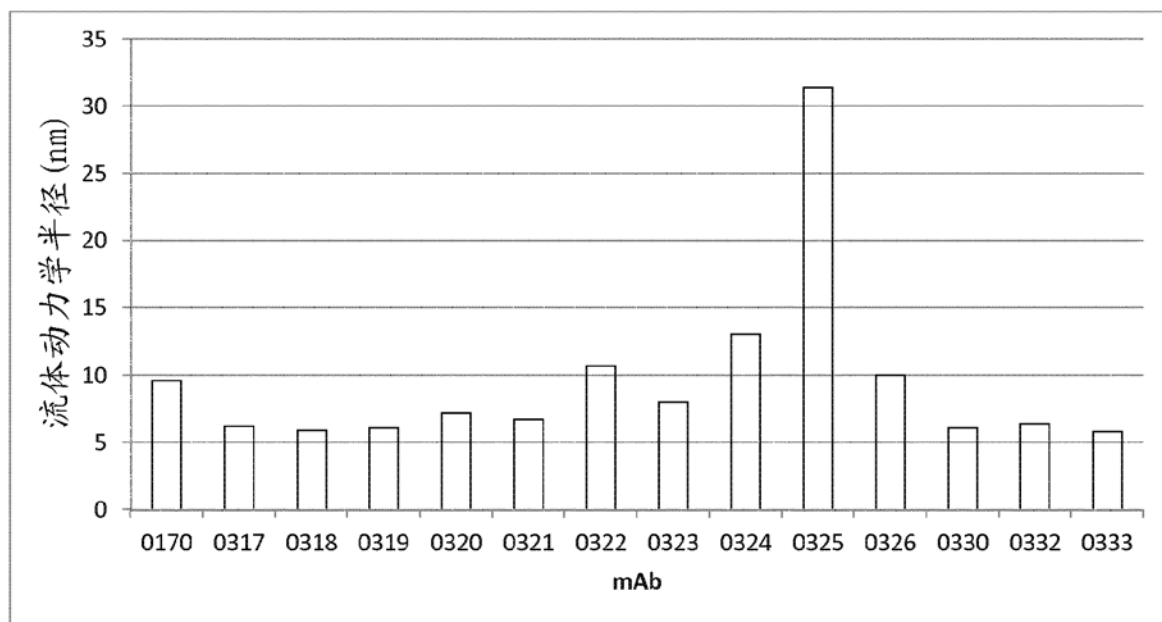


图 6