



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I605061 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：101145217

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 30 日

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

(30)優先權：	2012/02/15	歐洲專利局	12155641.9
	2012/02/15	美國	61/598,968
	2012/02/16	美國	61/599,447
	2012/03/12	歐洲專利局	12158974.1
	2012/07/18	歐洲專利局	12176892.3
	2012/07/18	美國	61/672,799
	2012/07/23	美國	61/674,434

(71)申請人：諾佛 儂迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)
丹麥

(72)發明人：史坦尼克 菲貝克 微斯特菲爾 STENNICKE, VIBEKE WESTPHAL (DK)；瑞德
克莉絲汀 布蘭德 READ, CHRISTINE BRENDER (DK)；葛瑞德 蘇珊妮 妮
德賈德寧 GRELL, SUSANNE NEDERGAARD (DK)；威柏克 查爾洛特 WIBERG,
CHARLOTTE (SE)；薩爾柏 路恩 SALBO, RUNE (DK)；漢瑞克森 安妮特
HENRIKSEN, ANETTE (DK)；帕德克傑爾 梭倫 PADKJAER, SOEREN (DK)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

Arts RJW et al., "TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex", Eur. Cytokine Netw., vol.22, no.1, p.11-14, 2011/03
EMBL: UniProtKB - Q9NP99 (TREM1_HUMAN) (公開日:2000/10/1)

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：11 共 120 頁

(54)名稱

會結合及阻斷表現在骨髓細胞上觸發受體-1 (TREM-1) 之抗體

ANTIBODIES THAT BIND AND BLOCK TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID
CELLS-1 (TREM-1)

(57)摘要

本發明係關於能夠特異性結合 TREM-1 且防止 TREM-1 活化的抗體，TREM-1 為一種表現在單核細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球上的蛋白質。此等抗體可用於治療患有諸如類風濕性關節炎及發炎性腸病之發炎疾病的個體。

The invention relates to antibodies that are capable of specifically binding TREM-1 and preventing the activation of TREM-1, a protein expressed on monocytes, macrophages and neutrophils. Such antibodies find utility in the treatment of individuals with an inflammatory disease, such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease.

指定代表圖：

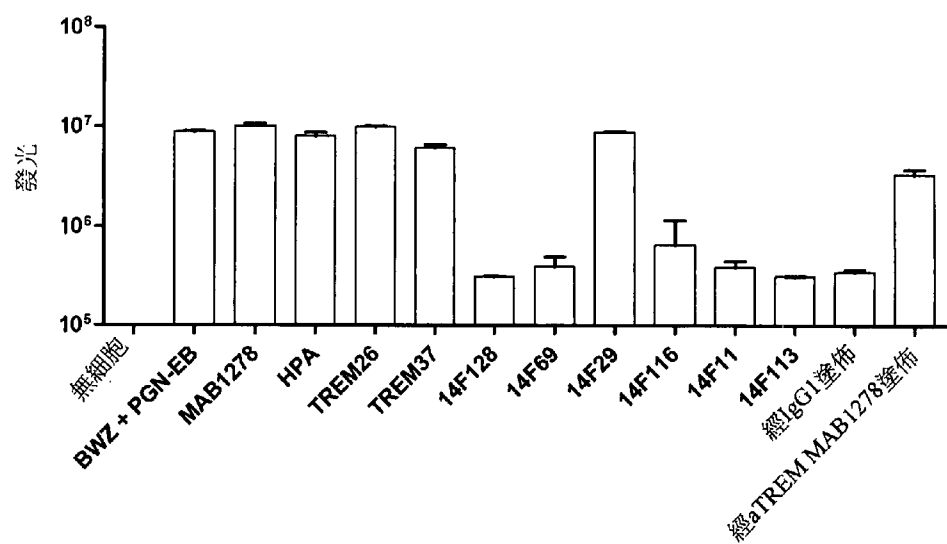


圖1

發明摘要

104 年 11 月 26 日替換頁

64 年 11 月 26 日修正替換頁

※ 申請案號：101145217

※ 申請日：101.11.30

※IPC 分類：G07K 16/28 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

會結合及阻斷表現在骨髓細胞上觸發受體-1 (TREM-1)之抗體

ANTIBODIES THAT BIND AND BLOCK TRIGGERING RECEPTOR
EXPRESSED ON MYELOID CELLS-1 (TREM-1)

【中文】

本發明係關於能夠特異性結合 TREM-1 且防止 TREM-1 活化的抗體，TREM-1 為一種表現在單核細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球上的蛋白質。此等抗體可用於治療患有諸如類風濕性關節炎及發炎性腸病之發炎疾病的個體。

【英文】

The invention relates to antibodies that are capable of specifically binding TREM-1 and preventing the activation of TREM-1, a protein expressed on monocytes, macrophages and neutrophils. Such antibodies find utility in the treatment of individuals with an inflammatory disease, such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease.

104 年 11 月 26 日 修 正 替 換 頁

104 年 11 月 26 日 替 換 頁

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

104 年 11 月 26 日修正替換頁

【發明名稱】(中文/英文)

會結合及阻斷表現在骨髓細胞上觸發受體-1 (TREM-1)之抗體

ANTIBODIES THAT BIND AND BLOCK TRIGGERING RECEPTOR
EXPRESSED ON MYELOID CELLS-1 (TREM-1)

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種鑑別功能性 TREM-1 抗體之方法。本發明亦關於能夠特異性結合 TREM-1 且能夠降低或阻斷 TREM-1 活性(信號傳導及/或活化)之抗體。此外，本發明係關於此等抗體之用途，諸如治療性及醫藥用途。

【先前技術】

【0002】 表現在骨髓細胞上的觸發受體-1 (TREM-1) 為表現在單核細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球上的受體。當活化時，TREM-1 與信號傳導蛋白 DAP12 締合且觸發促炎性細胞激素自表現其的細胞中釋放 (Bouchon 等人, J. Immunol. 2000; 164(10): 4991-4995)。TREM-1 mRNA 及蛋白質表現已知在患有敗血症、類風濕性關節炎 (RA) 及發炎性腸病 (IBD) 之個體的骨髓細胞中受到上調。愈來愈多的科學證據支持 TREM-1 因募集至發炎區域之 TREM-1 陽性單核細胞及嗜中性白血球加劇發炎而促進發炎疾病之發展及進展的理論 (Bouchon 等人, Nature 2001; 410: 1103-1107; Schenk 等人, Clin Invest. 2007; 117(10): 3097-3106; Kuai 等人, Rheumatology (Oxford). 2009; 48(11):1352-1358)。

【0003】 能夠結合 TREM-1 的抗體已為人所知，包括可市購的 TREM26 及 TREM37 (目錄號分別為 314902 及 316102, Biolegend, San Diego, CA 92121, USA)、MAB1278 (目錄號 MAB1278, R&D Systems, Minneapolis, MN

55413, USA)、mAb 6B1 (目錄號 HM2252, Hycult Biotech, Uden, Netherlands) 及抗 TREM-1 2E2 (目錄號 HPA005563, Sigma-Aldrich, Denmark)。所有已知的 TREM-1 抗體當固著時均具有促效性；亦即，其增強細胞激素自單核細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球的釋放。已知 TREM-1 抗體的另一個特徵在於，其與來自靈長類動物（諸如食蟹獼猴或恆河猴）的 TREM-1 無交叉反應，此意謂已知抗體在此等動物中無法測試到。

【0004】 因此，此項技術中需要一種能夠結合且阻斷 TREM-1 功能的抗體。此項技術中需要一種能夠防止 TREM-1 形成二聚體/多聚體的 TREM-1 抗體。此項技術中需要一種能夠阻斷 TREM-1 活化及信號傳導的 TREM-1 抗體。此項技術中需要一種能夠干擾 TREM-1 與其配位體之間相互作用的 TREM-1 抗體。此項技術中需要一種能夠阻斷細胞激素自骨髓細胞釋放的 TREM-1 抗體。此項技術中需要一種當溶解時或固著時具有很小或無促效活性的 TREM-1 抗體。此項技術中亦需要一種能夠結合人類 TREM-1 與來自一或多種其他物種（諸如靈長類動物）之 TREM-1 的抗體，以便進行毒理學研究以及評估抗體在適合動物模型中的藥物動力學及藥效學。

【0005】 本文中揭示適用作藥品的 TREM-1 抗體。此等抗體可對患有敗血症或慢性發炎疾病（諸如類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎及發炎性腸病）之個體的生活品質具有實質性影響。

【發明內容】

【0006】 本發明係關於一種鑑別功能性 TREM-1 抗體之方法，包含 (a) 培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；(b) 當該第一細胞與 TREM-1 調節劑一起培育時，量測該細胞之活性；(c) 使 (b) 之共培養物與 TREM-1 抗體接觸；及 (d) 測得該第一細胞之活性小於或大於 (b) 中所量測之活性。

【0007】 該方法可經改適以鑑別阻斷性 TREM-1 分子，諸如抗體。

該鑑別阻斷性 TREM-1 抗體之方法包含 (a) 培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；(b) 當該第一細胞與活化化合物（諸如 TREM-1 配位體）或經活化之嗜中性白血球一起培育時，量測該細胞之活性；(c) 使該第一細胞與該活化化合物（諸如 TREM-1 配位體）或經活化之嗜中性白血球之共培養物與 TREM-1 抗體接觸；及 (d) 測得該第一細胞之活性小於 (b) 中所量測之活性。

【0008】 該方法可經改適以鑑別刺激性 TREM-1 抗體。該鑑別刺激性 TREM-1 抗體之方法包含 (a) 培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；(b) 量測該第一細胞之活性；(c) 使該細胞與 TREM-1 抗體接觸/一起培育；及 (d) 測得該第一細胞之活性大於 (b) 中所量測之活性。

【0009】 第一細胞可來源於造血系統。(b) 中之調節劑可為經活化之嗜中性白血球或 TREM-1 配位體。信號傳導蛋白可為 DAP10、DAP12、TCR ξ 、Fc γ RIII 及 Fc 受體，或其一部分。信號傳導蛋白可經由轉錄因子（諸如 NFAT 或 NF κ B）傳導信號。報導基因可為不天然表現於該第一細胞中的基因且可為編碼 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、綠色螢光蛋白 (GFP) 或氯黴素轉移酶的基因。本發明亦關於藉由本發明方法可鑑別的刺激性 TREM-1 抗體。

【0010】 本發明係關於能夠特異性結合至 TREM-1 且能夠阻斷 TREM-1 功能的抗體。該等抗體能夠防止或減少 TREM-1 之二聚化或多聚化。該等抗體能夠阻斷 TREM-1 與其配位體之間的相互作用，或該等抗體能夠阻斷由 TREM-1 配位體誘導的 TREM-1 功能。TREM-1 可為人類 TREM-1 及/或來源於除人類外之另一物種的 TREM-1，諸如來源於除人類外之另一靈長類動物的 TREM-1。

【0011】 本發明之抗體能夠與 mAb 0170 競爭結合至人類 TREM-1。

本發明之抗體能夠特異性結合包含 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之胺基酸 D38 至 F48 的多肽。本發明之抗體可具有包含以下之抗原決定基：選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 D38、V39、K40、C41、D42、Y43、T44 及 L45 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個或全部，及選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 E46、K47 及 F48 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個或全部，如使用 HX-MS 所測定。本發明之抗體可具有包含以下之抗原決定基：選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 D42、E46、D92 及 H93 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個、3 個或全部，如藉由量測結合至 TREM-1 變異體之抗體所測定。

【0012】 本發明之抗體能夠與 mAb 0170 競爭結合至食蟹獼猴 TREM-1。本發明之抗體能夠特異性結合包含食蟹獼猴 TREM-1 (SEQ ID NO: 12) 之胺基酸 E19 至 L26 或 SEQ ID NO: 21 之對應胺基酸的多肽，如使用 HX-MS 所測定。

【0013】 本發明之抗體可用作治療患有一或多種自體免疫疾病及/或慢性炎症之個體的藥品。因此，本發明亦關於一種治療患有一或多種自體免疫疾病及/或慢性炎症之個體的方法。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1：諸如 14F128 及 14F113 之抗體可降低 BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ 細胞系 (本文中亦稱為「BWZ/hTREM-1 報導細胞」) 活化，而可市購的抗體 MAB1278 (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA: 目錄號 MAB1278)、抗 TREM-1 HPA (Sigma, USA: 目錄號 HPA005563)、aTREM26 (Biolegend, San Diego, CA 92121, USA: 目錄號 314902) 及 aTREM37 (Biolegend, San Diego, CA 92121, USA: 目錄號 316102) 則不能。

圖 2：BWZ/hTREM-1 報導細胞單獨或與 TLRL 預刺激之嗜中性白血球共培養。相較於未活化的嗜中性白血球，經 TLRL 活化之嗜中性白血球能夠誘導信號（發光）增加 15 倍（參見最後兩個柱形圖）。在此實驗中，陽性對照（盤結合型促效性 MAB1278（R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA: 目錄號 MAB1278））產生 32 倍誘導（參見第二個柱形圖）。資料以平均值 $\pm$ SEM（n=3）作圖。

圖 3：歸一化報導體檢定（其中 TREM-1 由經 PGN 活化之嗜中性白血球刺激）顯示，可市購的抗體 TREM-26（目錄號 314902，Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）、TREM-37（目錄號 316102，Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）、MAB1278（目錄號 MAB1278，R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA）及抗 TREM-1 HPA（目錄號 HPA005563，Sigma, St Louis, MO, USA）為在報導體檢定中增強 TREM-1 依賴性發光信號（產生信號高於 1）的促效性抗體。經鑑別為 5F27A1 及 14F69 的抗體顯示為最佳阻斷劑（產生信號小於 0.5）。資料以平均值 $\pm$ SEM（n=3）作圖。同型對照物 MAB002（目錄號 MAB002，R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA）。所有抗體以 1 μ g/ml 使用。

圖 4：BWZ/hTREM-1 報導體檢定中之活性。在 x 軸上，TREM-1 阻斷活性顯示為當添加 0.2 μ g/ml 抗體至已用 PGN 刺激之嗜中性白血球預活化之 BWZ/hTREM-1 報導細胞中時殘留的活性。當 TREM-1 抗體為盤結合型抗體時，一些抗體（包括所有可市購的 TREM-1 抗體）能夠交叉結合 TREM-1 且從而活化 TREM-1。此活性在 y 軸上顯示。因此，左下角之框中顯示為點的抗體皆顯示不同於已知抗體的有利阻斷特性，而非促效特性。

圖 5：人類 TREM-1 抗體結合至來自恆河猴的 PBMC。在左上角中，顯示大部分抗體僅結合人類 TREM-1（每個黑點代表一種抗體）。一些抗體（諸如 mAb 0025 及 14F128、14F11、14F29、14F113 及 14F69）能夠結合至人

類 TREM-1 與恆河猴 TREM-1，從而顯示交叉反應性。

圖 6：抗人類 TREM-1 抗體結合至來自食蟹獼猴的 PBMC。圖 6A，在左上角中，顯示大部分抗體僅結合人類 TREM-1（每個黑點代表一種抗體）。一些抗體（諸如 mAb 0025 及 14F128、14F11、14F29）能夠結合人類 TREM-1 與食蟹獼猴 TREM-1，從而顯示交叉反應性。一些抗體（諸如 14F69 (mAb 0044)) 能夠同樣良好地結合食蟹獼猴 PBMC (圖 6B) 與人類 PBMC (圖 6C)。

圖 7：在 mAb 0023 或 mAb 0026 (A)、mAb 0024 或 Biolegend 純系 26 (B)、mAb 0025 (C) 或 RnD Biosystems 之 MAB1278 (D) 存在及不存在下，HX 分析之 hTREM-1 肽之序列範圍。初始序列顯示於 HX 分析之肽（顯示為橫槓）上方。在 mAb 存在與不存在下均顯示相似交換模式的肽係以白色顯示，而在 mAb 結合時即顯示氘併入減少的肽係以黑色顯示。框選序列區域界定抗原決定基。

圖 8：針對 hTREM-1 之 mAb 0025 之抗原決定基的結構性抗原決定基定位。hTREM-1 (pdb 1Q8M) 之結構係作為二聚體之一部分以黑色 C- α 線表示。hTREM-1 二聚體之另一部分以灰色條帶顯示，0025 抗原決定基以黑色顯示。

圖 9：BWZ/hTREM-1 報導細胞與 TREM-1 配位體複合物共培養反映出 TREM-1 mAb-0170 可劑量依賴性抑制 TREM-1 功能性。

圖 10：TREM-1 抗體阻斷了 PGLYRP-1 刺激的 M2 巨噬細胞釋放 TNF α 。

圖 11：人類 TREM-1 序列與食蟹獼猴 TREM-1 序列進行比對。兩者之間不同的胺基酸殘基係以粗體顯示。已顯示位於抗原決定基內的殘基（如使用 HX-MS 及表面電漿子共振所測定）突出顯示。

序列簡單說明

SEQ ID NO: 1 表示野生型 (wt) 人類 TREM-1 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 2 表示 m14F69 抗體之可變重鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 3 表示 m14F69 抗體之可變輕鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 4 表示第一人類化 TREM-1 抗體 (mAb 0170) 之重鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 5 表示第一人類化 TREM-1 抗體 (mAb 0170) 之輕鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 6 表示第二人類化 TREM-1 抗體 (mAb 0122) 之重鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 7 表示第二人類化 TREM-1 抗體 (mAb 0122) 之輕鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 8 表示 m14F128 抗體之重鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 9 表示 m14F128 抗體之輕鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 10 表示 m14F113 抗體之重鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 11 表示 m14F113 抗體之輕鏈之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 12 表示當在大腸桿菌 (*E. coli*) 中表現時，野生型 (wt) 食蟹獼猴(c)TREM-1 之胞外域之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 13 表示 K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6 (構築體 0222) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 14 表示 A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6 (構築體 0244) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 15 表示 A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6 (構築體 0245) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 16 表示引子之核酸序列。

SEQ ID NO: 17 表示引子之核酸序列。

SEQ ID NO: 18 表示人類(h) TREM-1(1-134)-His 6 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 19 表示 cTREM-1-Cmyc2-His6 (構築體 0238) 之胺基酸序

列。

SEQ ID NO: 20 表示 hTREM-1-Cmyc2-His6 (構築體 0247) 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 21 表示全長 cTREM-1 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 22 表示全長鼠科(m) TREM-1 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 23 表示全長 hPGLYRP1 之胺基酸序列。

【實施方式】

【0015】 TREM-1 為由 234 個胺基酸組成的跨膜蛋白，包括單一細胞外免疫球蛋白結構域及具有不明顯信號傳導基元的短細胞質尾。活化時，TREM-1 與含有 ITAM 之信號傳導接附蛋白 DAP12 締合。下游信號傳導可包括 NFAT 轉錄因子之活化，引起促炎性細胞激素產生上調。

【0016】 本發明係關於能夠特異性結合及阻斷 TREM-1 功能的抗體。本發明之抗體可藉由減少/阻斷 TREM-1 活化及下游信號傳導來阻斷 TREM-1 功能。

【0017】 本發明之抗體可藉由若干不同機制之一或組合來阻斷 TREM-1，從而直接或間接地阻斷 TREM-1。舉例而言，本發明之抗體可防止 TREM-1 之天然配位體肽聚糖識別蛋白 1 (PGLYRP1) 與 TREM-1 形成功能性複合物且/或本發明之抗體可藉由防止個別 TREM-1 分子形成二聚體或多聚體來阻斷 TREM-1。TREM-1 抗體可減少或防止 TREM-1 二聚化或多聚化，TREM-1 抗體能夠結合至 TREM-1 之一部分（否則，該部分會存在於 TREM-1 二聚體之界面中），從而防止個別 TREM-1 分子彼此相締合。干擾 TREM-1 與其配位體相互作用之 TREM-1 抗體可減少或防止 TREM-1 二聚化或多聚化。本發明之抗體可阻斷 PGLYRP1 誘導之 TREM-1 活化。PGLYRP1 (一種高度保守之具有 196 個胺基酸長度的蛋白質，其由信號肽及肽聚糖結合域組成) 表現於嗜中性白血球中且在其活化時釋放。本發明之抗體可下

調骨髓細胞釋放促炎性細胞激素。本發明之抗體可阻斷巨噬細胞、嗜中性白血球、滑液組織細胞及/或報導細胞釋放 $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{MIP-1 } \beta$ 、 MCP-1 、 $\text{IL-1 } \beta$ 、 GM-CSF 、 IL-6 及/或 IL-8 ，如本文所揭示。

【0018】 本發明之抗體能夠結合人類 TREM-1 與來自除人類外之另一物種的 TREM-1。如本文所用之術語「TREM-1」因此涵蓋可來源於任何適合生物體之 TREM-1 的任何天然存在形式。舉例而言，如本文所述使用之 TREM-1 可為脊椎動物 TREM-1，諸如哺乳動物 TREM-1，諸如來源於靈長類動物（諸如人類、黑猩猩、食蟹獼猴或恆河猴）；齧齒動物（諸如小鼠或大鼠）、兔類動物（諸如兔）或偶蹄類動物（諸如奶牛、綿羊、豬或駱駝）之 TREM-1。TREM-1 較佳為 SEQ ID NO: 1（人類 TREM-1）。TREM-1 可為 TREM-1 之成熟形式，諸如已在適合細胞內經歷轉譯後加工的 TREM-1 蛋白。此成熟 TREM-1 蛋白可經例如糖基化。TREM-1 可為全長 TREM-1 蛋白。

【0019】 本發明之抗體可為單株抗體，就此而言，其直接或間接地來源於 B 淋巴細胞之單一純系。TREM-1 抗體可使用例如實施例中所述之方法產生、篩檢及純化。簡言之，可用 TREM-1、表現 TREM-1 之細胞或兩者之組合使適合小鼠（諸如 TREM-1 或 TREM-1/TREM-3 基因剔除（KO）小鼠）免疫。

【0020】 本發明之抗體可為多株抗體，就此而言，為本發明之單株抗體之混合物。

【0021】 初次篩檢融合瘤上清液可使用直接 ELISA 或 FMAT 進行且二次篩檢可使用流動式細胞量測術進行。接著可在報導基因檢定中篩檢陽性融合瘤上清液。

【0022】 抗體可重組表現於原核或真核細胞中。原核細胞可為大腸桿菌。真核細胞可為酵母、昆蟲或哺乳動物細胞，諸如來源於靈長類動物（諸如人類、黑猩猩、食蟹獼猴或恆河猴）、齧齒動物（諸如小鼠或大鼠）、

兔類動物（諸如兔）或偶蹄類動物（諸如奶牛、綿羊、豬或駱駝）之生物體之細胞。適合的哺乳動物細胞系包括（但不限於）HEK293 細胞、CHO 細胞及海拉細胞（HELA cells）。TREM-1 抗體亦可藉由熟習此項技術者已知的其他方法產生，諸如噬菌體呈現術或酵母呈現術。

【0023】 抗體一經產生，即可使用實施例中所述之方法，針對結合至例如全長 TREM-1 或其突變體加以篩檢。

【0024】 本發明之一個具體實例為鑑別功能性 TREM-1 抗體之方法。能夠特異性結合 TREM-1 且對 TREM-1 活化及下游信號傳導具有任何作用的抗體在本文中稱為「功能性 TREM-1 抗體」。本文中之「功能性」TREM-1 抗體係指能夠阻斷或刺激 TREM-1 的抗體。鑑別功能性 TREM-1 抗體之方法包含（a）培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；（b）當該第一細胞與 TREM-1 調節劑一起培育時，量測該細胞之活性；（c）使（b）之共培養物與 TREM-1 抗體接觸；及（d）測得該第一細胞之活性小於或大於（b）中所量測之活性。

【0025】 （a）中之「第一細胞」可為來源於造血系統之細胞，諸如骨髓細胞，諸如 T 細胞。（a）中之信號傳導蛋白可為能夠與 TREM-1 形成複合物的任何信號傳導蛋白。適合的信號傳導蛋白包括 DAP10、DAP12、TCR ξ 、Fc γ RIII 及 Fc 受體，或其一部分。（a）中之報導構築體可為能夠經由信號傳導蛋白活化及產生可識別信號的任何構築體。適合的報導構築體包含轉錄因子及報導基因。信號傳導蛋白可經由選自由 NFAT 及 NF κ B 組成之群的轉錄因子傳導信號。報導基因為不天然表現於該第一細胞中的基因且可為編碼 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、綠色螢光蛋白（GFP）或氯黴素轉移酶的基因。該第一細胞可使用此項技術中熟知的方法經轉錄因子及報導基因轉染。

【0026】 實施例中所述之「BWZ/hTREM-1 報導細胞」為「第一細胞」

之一個實例。

【0027】 (b)中之調節劑可為 TREM-1 配位體或經活化之嗜中性白血球。(c)中之「TREM-1 抗體」可為 TREM-1 特異性融合瘤上清液或純化抗體。(d)中所量測之活性為報導構築體所產生的信號。此信號傳導之一實例為由 NFAT 驅動之 LacZ (β -內醯胺酶螢光素酶) 產生所引起的發光。

【0028】 該方法可經改適以鑑別阻斷性 TREM-1 抗體。該鑑別阻斷性 TREM-1 抗體之方法包含 (a) 培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；(b) 當該第一細胞與經活化之嗜中性白血球一起培育時，量測該細胞之活性；(c) 使該第一細胞與該經活化之嗜中性白血球之共培養物與 TREM-1 抗體接觸；及 (d) 測得第一細胞之活性小於 (b) 中所量測之活性。

【0029】 該方法亦可經改適以鑑別刺激性 TREM-1 抗體。該鑑別刺激性 TREM-1 抗體之方法包含 (a) 培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；(b) 量測該第一細胞之活性；(c) 使該細胞與 TREM-1 抗體接觸/一起培育；及 (d) 測得該第一細胞之活性大於 (b) 中所量測之活性。

【0030】 本發明係關於阻斷性 TREM-1 抗體，其可藉由本文揭示之鑑別阻斷性抗體之方法加以鑑別。當使用上文及實施例中所述的方法測試時，本發明之抗體在小於 100 μ g/ml (諸如小於 90 μ g/ml，諸如小於 80 μ g/ml，諸如小於 70 μ g/ml，諸如小於 60 μ g/ml，諸如小於 50 μ g/ml，諸如小於 40 μ g/ml，諸如小於 30 μ g/ml，諸如小於 20 μ g/ml，諸如小於 10 μ g/ml，諸如小於 5 μ g/ml，諸如小於 1 μ g/ml) 的濃度下能夠將該第一細胞之活性降低 50%，諸如 60%，諸如 70%，諸如 80%，諸如 90%，諸如 95%，諸如 100%。本發明之抗體能夠完全消除第一細胞之活性。當使用上文及實施例中所述的方法測試時，本發明之抗體在小於 1 μ g/ml (諸如小於 0.9

$\mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.8\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.7\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.6\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.4\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.3\ \mu\text{g/ml}$ ，諸如小於 $0.2\ \mu\text{g/ml}$ ）的濃度下能夠消除第一細胞之活性。

【0031】 本發明亦關於可藉由除本文所揭示方法外之其他手段鑑別的阻斷性 TREM-1 抗體。

【0032】 本文中之術語「抗體 (antibody)」係指一種來源於生殖系免疫球蛋白序列的蛋白質，其能夠特異性結合至抗原 (TREM-1) 或其一部分。該術語包括任何種類或同型 (亦即 IgA、IgE、IgG、IgM 及/或 IgY) 之全長抗體及其任何單鏈或片段。特異性結合至抗原或其一部分的抗體可專一地結合至彼抗原或其一部分，或其可結合至有限數目個同源抗原或其一部分。全長抗體通常包含至少四個多肽鏈：兩個重鏈 (H) 及兩個輕鏈 (L)，藉由二硫鍵相互連接。與醫藥特別有關之一個免疫球蛋白子類為 IgG 家族。在人類中，根據重鏈恆定區之序列，可將 IgG 種類再分成 4 個子類：IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。根據序列組成之差異，可將輕鏈分成兩種類型： κ 及 λ 。IgG 分子係由兩個重鏈 (經兩個或兩個以上二硫鍵相互連接) 及兩個輕鏈 (各經二硫鍵連接至重鏈) 組成。重鏈可包含重鏈可變區 (VH) 及至多三個重鏈恆定區 (CH)：CH1、CH2 及 CH3。輕鏈可包含輕鏈可變區 (VL) 及輕鏈恆定區 (CL)。VH 及 VL 區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區 (CDR)，其中散置較保守區域，稱為構架區 (FR)。VH 及 VL 區典型地由三個 CDR 及四個 FR 組成，其自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之高變區形成能夠與抗原相互作用的「結合」域，而抗體之恆定區可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括(但不限於)免疫系統之各種細胞 (效應細胞)、Fc 受體及典型補體系統之第一組分 (C1q)。

【0033】 本發明之抗體可加以分離。術語「分離抗體 (isolated

antibody)」係指一種抗體，其已自產生其之環境中的其他組分分離及/或回收，及/或已自產生其之環境中存在之組分混合物純化。

【0034】 在本發明之情形中，抗體之某些抗原結合片段可為適合的，因為已顯示抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體之片段執行。術語抗體之「抗原結合片段 (antigen-binding fragment)」係指抗體之一或多個片段，其保留特異性結合至如本文所述之抗原（諸如 TREM-1）的能力。抗原結合片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、F(ab)₃、Fv（典型地為抗體之單臂之 VL 及 VH 域）、單鏈 Fv（scFv；參見例如 Bird 等人, Science 1988; 242:42S-426；及 Huston 等人, PNAS 1988; 85:5879-5883）、dsFv、Fd（典型地為 VH 及 CH1 域）及 dAb（典型地為 VH 域）片段；VH、VL、VhH 及 V-NAR 域；包含單一 VH 及單一 VL 鏈的單價分子；微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及 κ 抗體（參見例如 Ill 等人, Protein Eng 1997;10:949-57）；駱駝 IgG；IgNAR；以及一或多個分離 CDR 或功能性互補位，其中分離 CDR 或抗原結合殘基或多肽可締合或連接在一起以便形成功能性抗體片段。各種類型的抗體片段已描述或評述於例如 Holliger 及 Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136；WO2005040219，及已公開之美國專利申請案 20050238646 及 20020161201 中。此等抗體片段可使用熟習此項技術者已知的習知技術獲得，且可以與完整抗體相同的方式篩檢該等片段的效用。

【0035】 本發明之抗體可為人類抗體或人類化抗體。如本文所用，術語「人類抗體 (human antibody)」意欲包括具有其中構架區之至少一部分及/或 CDR 區之至少一部分來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區的抗體。（舉例而言，人類抗體可具有其中構架區與 CDR 區均來源於人類生殖系免疫球蛋白序列的可變區）。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（例如藉由試管內隨機或位點特異

性突變誘發引入或藉由活體內體細胞突變引入的突變)。

【0036】 此人類抗體可為人類單株抗體。此人類單株抗體可由融合瘤產生，此融合瘤包括獲自非人類轉殖基因動物（例如基因組包含人類重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因的轉殖基因小鼠）之 B 細胞與不朽化細胞之融合物。

【0037】 人類抗體可自序列文庫中分離，序列文庫係基於人類生殖系序列之選擇而建立且進一步多樣化而具有天然及合成序列多樣性。

【0038】 人類抗體可藉由試管內使人類淋巴細胞免疫、隨後用愛潑斯坦-巴爾病毒（Epstein-Barr virus）轉型淋巴細胞來製備。

【0039】 術語「人類抗體衍生物（human antibody derivative）」係指人類抗體之任何修飾形式，諸如該抗體與另一種藥劑或抗體之結合物。

【0040】 如本文所用，術語「人類化抗體（humanised antibody）」係指含有一或多個來源於非人類免疫球蛋白之序列（CDR 區或其一部分）的人類/非人類嵌合抗體。因此人類化抗體為一種人類免疫球蛋白（受者抗體），其中至少來源於該受者之高變區的殘基被來源於非人類物種（諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物）且具有所要特異性、親和力、序列組成及功能性之抗體（供者抗體）之高變區的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 FR 殘基被相應非人類殘基置換。此種修飾之一實例為引入一或多個所謂的回復突變，其典型地為來源於供者抗體之胺基酸殘基。可使用熟習此項技術者已知的重組技術對抗體進行人類化（參見例如 Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, 第 248 卷，Benny K. C. Lo 編）。適用於輕鏈與重鏈可變域的人類受者構架可依據例如序列或結構同源性加以鑑別。或者，可例如基於對結構、生物物理學及生物化學特性的瞭解來使用固定的受者構架。受者構架可來源於生殖系或來源於成熟抗體序列。供者抗體之 CDR 區可藉由 CDR 移植來轉移。藉由鑑別其中再引入（回復突變）

供者抗體之胺基酸殘基對人類化抗體之特性具有有益影響的關鍵構架位置，可針對例如親和力、功能性及生物物理學特性進一步最佳化 CDR 移植之人類化抗體。除來源於供者抗體之回復突變外，可藉由將生殖系殘基引入 CDR 或構架區、消除免疫原性抗原決定基、定點突變誘發、親和力成熟等方式對人類化抗體進行工程改造。

【0041】 此外，人類化抗體可包含未發現於受者抗體或供者抗體中的殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體包含至少一個（典型地為兩個）可變域，其中所有或實質上所有 CDR 區對應於非人類免疫球蛋白之 CDR 區且其中所有或實質上所有 FR 殘基為人類免疫球蛋白序列之 FR 殘基。人類化抗體視情況亦可包含免疫球蛋白恆定區 (Fc) 之至少一部分，典型地為人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。

【0042】 術語「人類化抗體衍生物 (humanised antibody derivative)」係指人類化抗體之任何修飾形式，諸如該抗體與另一藥劑或抗體之結合物。

【0043】 如本文所用，術語「嵌合抗體 (chimeric antibody)」係指一種抗體，其輕鏈與重鏈基因已由來源於不同物種的免疫球蛋白可變區及恆定區基因、典型地藉由遺傳工程構築而成。舉例而言，可將來自小鼠單株抗體之基因之可變區段連接至人類恆定區段。

【0044】 抗體之片段可結晶區 (「Fc 區」/「Fc 域」) 為抗體之 N 端區，其包含 CH2 及 CH3 恆定域。Fc 域可與稱為 Fc 受體的細胞表面受體以及補體系統之一些蛋白質相互作用。Fc 區使得抗體能夠與免疫系統相互作用。在本發明之一個態樣中，抗體可經工程改造以在 Fc 區內包括修飾，此可典型地改變其一或多種功能特性，尤其諸如血清半衰期、補體固定、Fc-受體結合、蛋白質穩定性及/或抗原依賴性細胞介導之細胞毒性，或其不存在。此外，本發明之抗體可經化學修飾（例如可將一或多個化學部分連接至抗體）或經修飾而改變其糖基化，再改變該抗體之一或多種功能特性。IgG1

抗體可攜帶經修飾之 Fc 域，該 Fc 域包含一或多個且也許是所有以下突變，該等突變分別引起針對某些 Fc 受體（L234A、L235E 及 G237A）的親和力降低及 C1q 介導之補體固定減少（A330S 及 P331S）（殘基編號係根據 EU 索引）。

【0045】 本發明之抗體之同型可為 IgG，諸如 IgG1，諸如 IgG2，諸如 IgG4。需要時，抗體之種類可藉由已知技術「切換」。舉例而言，原先以 IgM 分子形式產生的抗體可切換種類為 IgG 抗體。種類切換技術亦可用於將一個 IgG 子類轉換為另一子類，例如自 IgG1 轉換為 IgG2 或 IgG4；自 IgG2 轉換為 IgG1 或 IgG4；或自 IgG4 轉換為 IgG1 或 IgG2。亦可藉由將來自不同 IgG 子類的區域組合來對抗體進行工程改造以產生恆定區嵌合分子。

【0046】 在一個具體實例中，CH1 之鉸鏈區經修飾，使得鉸鏈區中半胱氨酸殘基數目改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於例如 Bodmer 等人之美國專利第 5,677,425 號中。

【0047】 恆定區可經修飾以使抗體穩定，例如降低二價抗體分離成兩個單價 VH-VL 片段的風險。舉例而言，在 IgG4 恆定區中，殘基 S228（殘基編號係根據 EU 索引）可突變為脯氨酸（P）殘基，以使鉸鏈處重鏈間二硫橋的形成穩定化（參見例如 Angal 等人, Mol Immunol. 1995; 30: 105-8）。

【0048】 抗體或其片段亦可按照其互補決定區（CDR）定義。本文使用之術語「互補決定區（complementarity-determining region）」或「高變區（hypervariable region）」係指其中涉及抗原結合之胺基酸殘基所處的抗體區域。高變區或 CDR 可以在抗體可變域之胺基酸比對中具有最高變異性的區域加以鑑別。可利用資料庫鑑別 CDR，諸如 Kabat 資料庫，CDR 例如定義為包含輕鏈可變域中之胺基酸殘基 24-34（L1）、50-56（L2）及 89-97（L3）及重鏈可變域中之 31-35（H1）、50-65（H2）及 95-102（H3）；（Kabat 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, 美國健康及人類服務

部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH 公開號 91-3242)。或者，CDR 可定義為來自「高變環 (hypervariable loop)」之彼等殘基（輕鏈可變域中之殘基 26-33 (L1)、50-52 (L2) 及 91-96 (L3) 及重鏈可變域中之 26-32 (H1)、53-55 (H2) 及 96-101 (H3)；Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196: 901-917)。典型地，此區域內之胺基酸殘基編號係藉由 Kabat 等人（同上）所述之方法執行。諸如「Kabat 位置 (Kabat position)」、「Kabat 殘基 (Kabat residue)」及「根據 Kabat (according to Kabat)」一詞在本文中係指用於重鏈可變域或輕鏈可變域之此編號系統。使用 Kabat 編號系統，肽之實際線性胺基酸序列可含有較少或其他胺基酸，相當於縮短或插入可變域之構架區 (FR) 或 CDR。舉例而言，重鏈可變域可包括位於 CDR H2 之殘基 52 之後的胺基酸插入（殘基 52a、52b 及 52c，根據 Kabat）及位於重鏈 FR 殘基 82 之後的所插入殘基（例如殘基 82a、82b 及 82c 等，根據 Kabat）。指定抗體之殘基 Kabat 編號可藉由與「標準」Kabat 編號序列在抗體序列同源區比對來確定。

【0049】 術語「構架區 (framework region)」或「FR」殘基係指不在 CDR 內的彼等 VH 或 VL 胺基酸殘基，如本文所定義。

【0050】 m14F69 抗體具有如 SEQ ID NO: 2 中所示的可變重鏈序列及如 SEQ ID NO: 3 中所示的可變輕鏈序列。本發明之抗體可包含此可變重鏈序列及/或此可變輕鏈序列。m14F69 抗體具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 31 至 35、50 至 68 及 101 至 110 及 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 24 至 38、54 至 60 及 93 至 101 所示的 CDR 序列。本發明之抗體可包含此等 CDR 序列中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或全部 6 個。本發明之抗體可包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 101 至 110。

【0051】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 31 至 35 (TYAMH) 之 CDR1 序列，其中此等胺基酸之一可經不同胺基酸取代。

【0052】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 50 至 68 (RIRTKSSNYATYYADSVKD) 之 CDR2 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0053】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 101 至 110 (DMGQRRQFAY) 之 CDR3 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0054】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 24 至 38 (RASESVDTFDYSFLH) 之 CDR1 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0055】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 54 至 60 (RASNLES) 之 CDR2 序列，其中此等胺基酸中之一個或兩個可經不同胺基酸取代。

【0056】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 93 至 101 (QQSNEDPYT) 之 CDR3 序列，其中此等胺基酸中之一個或兩個可經不同胺基酸取代。

【0057】 mAb 0170 抗體具有如 SEQ ID NO: 4 中所示之重鏈序列及如 SEQ ID NO: 5 中所示之輕鏈序列。本發明之抗體可包含此重鏈序列及/或此輕鏈序列。mAb 0170 抗體具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 31 至 35、50 至 68 及 101 至 110 及 SEQ ID NO: 5 之胺基酸 24 至 38、54 至 60 及 93 至 101 所示的 CDR 序列。本發明之抗體可包含此等 CDR 序列中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或全部 6 個。

【0058】 mAb 0122 抗體具有如 SEQ ID NO: 6 中所示之重鏈序列及如 SEQ ID NO: 7 中所示之輕鏈序列。本發明之抗體可包含此重鏈序列及/或此輕鏈序列。mAb 0122 抗體具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 31 至 35、50 至 68 及 101 至 110 及 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 24 至 38、54 至 60 及 93 至 101 所示的

CDR 序列。本發明之抗體可包含此等 CDR 序列中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或全部 6 個。

【0059】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 31 至 35 (TYAMH) 之 CDRH1 序列，其中此等胺基酸之一可經不同胺基酸殘基取代。

【0060】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 50 至 68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) 之 CDRH2 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0061】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 101 至 110 (DMGIRRQFAY) 之 CDRH3 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0062】 本發明之抗體之重鏈可包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 101 至 110 (DMGQRRQFAY) 之 CDRH3 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0063】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 24 至 38 (RASESVDTFDYSFLH) 之 CDRL1 序列，其中此等胺基酸中之一個、兩個或三個可經不同胺基酸取代。

【0064】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 54 至 60 (RASNLES) 之 CDRL2 序列，其中此等胺基酸中之一個或兩個可經不同胺基酸取代。

【0065】 本發明之抗體之輕鏈可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 93 至 101 (QQSNEDPYT) 之 CDRL3 序列，其中此等胺基酸中之一或兩個可經不同胺基酸取代。

【0066】 m14F128 抗體具有如 SEQ ID NO: 8 中所示的重鏈及如 SEQ ID NO: 9 中所示的輕鏈。本發明之抗體可包含此可變重鏈序列及/或此可變

輕鏈序列。m14F128 抗體具有 SEQ ID NO: 8 之胺基酸 31 至 35、50 至 68 及 101 至 110 及 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 24 至 38、54 至 60 及 93 至 101 所示的 CDR 序列。本發明之抗體可包含此等 CDR 序列中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或全部 6 個。

【0067】 m14F113 抗體具有如 SEQ ID NO: 10 中所示的重鏈及如 SEQ ID NO: 11 中所示的輕鏈。本發明之抗體可包含此可變重鏈序列及/或此可變輕鏈序列。m14F113 抗體具有 SEQ ID NO: 10 之胺基酸 31 至 35、50 至 68 及 101 至 110 及 SEQ ID NO: 11 之胺基酸 24 至 38、54 至 60 及 93 至 101 所示的 CDR 序列。本發明之抗體可包含此等 CDR 序列中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或全部 6 個。本發明之抗體可包含 SEQ ID NO: 10 之胺基酸 101 至 110。

【0068】 術語「抗原 (antigen)」(Ag) 係指用於使具有免疫能力之脊椎動物免疫以產生識別 Ag 之抗體 (Ab) 的分子實體。本文中，Ag 稱謂更廣泛且通常意欲包括由 Ab 特異性識別的目標分子，因此包括免疫過程或用於產生 Ab 之其他過程（例如噬菌體呈現）中所用之分子的片段或模擬物。

【0069】 如本文所用，術語「抗原決定基 (epitope)」係在「抗原結合多肽」（諸如抗體 (Ab)）與其對應抗原 (Ag) 之分子間相互作用的情形中定義。一般而言，「抗原決定基」係指 Ab 特異性結合之 Ag 上的區域或區，亦即，與 Ab 實體接觸的區域或區。實體接觸可針對 Ab 及 Ag 分子中之原子經由多種準則（例如 2-6 Å 之截斷距離，諸如 3 Å，諸如 4 Å，諸如 5 Å；或溶劑可及性）加以定義。蛋白質抗原決定基在 Ag 中可包含直接涉及結合至 Ab 的胺基酸殘基（亦稱為抗原決定基之免疫顯性組分）及不直接涉及結合之其他胺基酸殘基，諸如 Ag 中被 Ab 有效阻斷的胺基酸殘基，亦即，「溶劑拒避表面 (solvent-excluded surface)」及/或 Ab 之「覆蓋區 (footprint)」內的胺基酸殘基。

【0070】 本文術語抗原決定基在特異性結合至 TREM-1 抗體之

TREM-1 的任何特定區域中包含兩種類型之結合區。TREM-1 可包含多個不同抗原決定基，可包括（不限於）由在成熟 TREM-1 構形中彼此位置靠近的一或多個非鄰接胺基酸組成的構形抗原決定基及全部或部分地由共價連接至 TREM-1 之分子結構（諸如碳水化合物基團）組成的轉譯後抗原決定基。

【0071】 指定抗體（Ab）/抗原（Ag）對之抗原決定基可使用各種實驗及計算性抗原決定基定位方法在不同的細節層次上加以描述及特性化。實驗方法包括突變誘發、X 射線結晶學、核磁共振（NMR）光譜法、氫氙交換質譜法（HX-MS）及各種競爭性結合方法；此項技術中已知的方法。因為每種方法依賴於獨特的原理，所以抗原決定基之描述與藉以測定其之方法密切相關。因此，視所用抗原決定基定位方法而定，指定 Ab/Ag 對之抗原決定基可以不同方式加以描述。

【0072】 用於 Ag 與 Ab 之間相互作用的抗原決定基在其細節最多的層次上可藉由定義以 Ag-Ab 相互作用存在之原子接觸的空間座標以及關於其對結合熱力學之相對影響的資訊加以描述。在細節較少的層次上，抗原決定基可藉由定義 Ag 與 Ab 之間原子接觸的空間座標加以特性化。在細節甚至更少的層次上，抗原決定基可藉由其所包含的胺基酸殘基加以特性化，如依據特定準則所定義，諸如 Ab:Ag 複合物中之原子之間的距離或溶劑可及性。在細節進一步較少的層次上，抗原決定基可依據功能，例如依據與其他 Ab 競爭性結合加以特性化。抗原決定基亦可更一般性定義為包含胺基酸殘基，其被另一胺基酸取代將改變 Ab 與 Ag 之間相互作用的特徵。

【0073】 在 Ab（例如 Fab 片段）與其 Ag 之間之複合物經 X 射線獲得之晶體結構藉由空間座標定義的情形中，術語抗原決定基在本文中（除非另外說明或與上下文相抵觸）特別定義為以所含重原子（亦即非氫原子）距離 Ab 中之重原子在例如 4 Å 之距離內為特徵的 TREM-1 殘基。

【0074】 抗原決定基之描述及定義（視所用抗原決定基定位方法而定）係在不同細節層次上獲得，由此事實可見，可在不同的細節層次上類似地對不同 Ab 之針對相同 Ag 的抗原決定基進行比較。

【0075】 在胺基酸層次上所述的抗原決定基（例如根據 X 射線結構確定）若含有同類胺基酸殘基，則稱其相同。若抗原決定基共有至少一個胺基酸，則稱抗原決定基重疊。若抗原決定基不共有胺基酸殘基，則稱抗原決定基為各別的（獨特的）。

【0076】 抗原決定基亦可藉由比較抗體對野生型人類 TREM-1 之結合動力學與對預期抗原決定基中具有丙胺酸突變之人類 TREM-1 變異體之結合動力學來間接地定義。抗體對人類 TREM-1 之變異體（其中胺基酸殘基已經丙胺酸殘基置換）的親和力降低或結合消除表明，突變胺基酸有助於該抗體與野生型人類 TREM-1 之間的相互作用。此方法提供抗原決定基之負向鑑別。依據蛋白質錯誤摺疊或去摺疊會產生與相互作用消除相似之結果的實情，該方法有損於有效定義抗原決定基。若存在交叉反應性抗體，則可藉由對直系同源目標蛋白質（例如食蟹獼猴 TREM-1）進行比較性功能獲得突變分析來補足分析。該比較將定義與例如食蟹獼猴 TREM-1 無交叉反應的抗體與可交叉反應之抗體之間的抗原決定基差異。

【0077】 亦可藉由量測抗體（或抗體片段）結合至野生型抗原（TREM-1）之變異體來間接地鑑別抗原決定基。若抗體或其片段結合例如人類而非食蟹獼猴 TREM-1 且若該抗體或其片段能夠結合食蟹獼猴 TREM-1 之部分人類化變異體，則此再獲得的結合表明，所取代的胺基酸殘基對於抗體與抗原之相互作用具有重要性。同樣地，結合至食蟹獼猴 TREM-1 弱於結合至人類 TREM-1 的抗人類 TREM-1 抗體（或其 Fab 片段）對食蟹獼猴 TREM-1 之人類化變異體的親和力增強可提供關於組成結合抗原決定基之殘基之身分的資訊。

【0078】 相同突變對任何指定交叉反應性抗體的影響使得有可能在可能的蛋白質錯誤摺疊（對兩種抗體之結合消除）與對人類 TREM-1 之相互作用喪失（結合至抗體之一，而與另一種抗體之結合消除）之間作出區分，同時明確地提供關於無交叉反應之抗體與可交叉反應之抗體之間在胺基酸層次上之抗原決定基差異的資訊。

【0079】 本發明之抗體能夠結合人類 TREM-1 之變異體。本發明之抗體能夠結合 K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6（SEQ ID NO: 13），如利用例如表面電漿子共振所測定。

【0080】 本發明之抗體能夠結合食蟹獼猴 TREM-1 之變異體。本發明之抗體能夠結合 A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6（SEQ ID NO: 14），如利用例如表面電漿子共振所測定。本發明之抗體能夠結合 A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6（SEQ ID NO: 15），如利用例如表面電漿子共振所測定。

【0081】 本發明之抗體能夠特異性結合 TREM-1，其中該抗體能夠特異性結合人類 TREM-1 之（i）至少一個選自由 A21、T22、K23、L24、T25、E26 組成之群的胺基酸殘基，及（ii）至少一個選自由以下組成之群的胺基酸殘基：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，及（iii）至少一個選自由 C113、V114、I115、Y116、Q117、P118 及 P119 組成之群的胺基酸殘基。

【0082】 本發明之抗體能夠特異性結合包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 D38 至 F48 之多肽（人類 TREM-1），如利用例如 HX-MS 所測定。

【0083】 本發明之抗體可具有包含以下之抗原決定基：SEQ ID NO: 1（人類 TREM-1）之胺基酸殘基 D38、V39、K40、C41、D42、Y43、T44 及

L45 中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個或全部，及選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 E46、K47 及 F48 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個或全部，如使用 HX-MS 所測定。

【0084】 本發明之抗體可具有包含以下之抗原決定基：選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 D42、E46、D92 及 H93 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個、3 個或全部，如使用 TREM-1 變異體及表面電漿子共振所測定。

【0085】 本發明之抗體可具有至少包含 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之胺基酸殘基 E46 及/或 D92 的抗原決定基，如使用 TREM-1 變異體及表面電漿子共振所測定。

【0086】 本發明之抗體可進一步包含選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 L31、I86 及 V101 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個或全部。

【0087】 本發明之抗體能夠特異性結合包含食蟹獼猴 TREM-1 (SEQ ID NO: 12) 之胺基酸殘基 E19 至 L26 或 SEQ ID NO: 21 之對應胺基酸的多肽，如使用例如 HX-MS 所測定。

【0088】 本發明之抗體能夠特異性結合人類 TREM-1，其中該抗體之抗原決定基包含選自由 SEQ ID NO: 1 之 V39、K40、C41、D42、Y43、L45、E46、K47、F48 及 A49 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個或全部。

【0089】 本發明之抗體能夠特異性結合人類 TREM-1，其中該抗體之抗原決定基包含 SEQ ID NO: 1 之 D42。本發明之抗體能夠特異性結合人類 TREM-1，其中該抗體之抗原決定基包含 SEQ ID NO: 1 之 E46。該抗體之抗原決定基可包含 SEQ ID NO: 1 之 V39、C41、D42、Y43、L45。該抗體之抗原決定基可包含 SEQ ID NO: 1 之 E46、K47 及 A49。該抗體之抗原決定基可

進一步包含 SEQ ID NO: 1 之 F48。

【0090】 反過來看，術語「互補位 (paratope)」之定義來源於「抗原決定基」之上述定義。因此，術語「互補位」係指 Ab 上之由 Ag 特異性結合的區域或區，亦即，與 Ag 產生實體接觸的區域或區。

【0091】 在 Ab（諸如 Fab 片段）與其 Ag 之間之複合物經 X 射線獲得之晶體結構藉由空間座標定義的情形中，術語互補位在本文中（除非另外說明或與上下文相抵觸）特別定義為以所含重原子（亦即非氫原子）距離 TREM-1 中之重原子在 4 Å 之距離內為特徵的 Ag 殘基。

● 【0092】 指定抗體 (Ab) / 抗原 (Ag) 對之抗原決定基及互補位可藉由常規方法鑑別。舉例而言，抗原決定基之一般定位可藉由評估抗體結合至 TREM-1 多肽之不同片段或變異體的能力來確定。TREM-1 內之與抗體 (抗原決定基) 接觸的特定胺基酸及抗體內之與 TREM-1 (互補位) 接觸的特定胺基酸亦可使用常規方法確定。舉例而言，可將抗體與目標分子合併且可使 Ab:Ag 複合物結晶。複合物之晶體結構可加以測定且用於鑑別抗體與其目標之間相互作用的特定位點。

● 【0093】 結合至相同抗原的抗體可根據其同時結合至其共同抗原的能力特性化且可經受「競爭結合」/「分組 (binning)」。在本發明情形中，術語「分組」係指一種對結合至相同抗原之抗體進行分組的方法。抗體「分組」可基於兩種抗體在基於標準技術（諸如表面電漿子共振 (SPR)、ELISA 或流動式細胞量測術）之檢定中對其共同抗原的競爭結合。

【0094】 抗體「組 (bin)」係利用參考抗體加以定義。若第二抗體不能與參考抗體同時結合至抗原，則稱第二抗體與參考抗體屬於同「組」。在此情況下，參考抗體與第二抗體競爭性結合抗原之相同部分且杜撰為「競爭性抗體」。若第二抗體能夠與參考抗體同時結合至抗原，則稱第二抗體屬於各別「組」。在此情況下，參考抗體與第二抗體不能競爭性結合抗原之相

同部分且杜撰為「非競爭性抗體」。

【0095】 抗體「分組」不能提供關於抗原決定基的直接資訊。競爭性抗體，亦即屬於同「組」的抗體，可具有相同抗原決定基、重疊抗原決定基，或甚至是各別的抗原決定基。若參考抗體結合至抗原上之其抗原決定基佔據了第二抗體接觸抗原上之其抗原決定基所必需的空間（「空間位阻」），則為重疊抗原決定基。非競爭性抗體通常具有各別的抗原決定基。

【0096】 本發明之抗體可與 mAb 0170 競爭結合至人類 TREM-1。本發明之抗體可與 mAb 0170 競爭結合至食蟹獼猴 TREM-1。換言之，本發明之抗體可與 mAb 0170 屬於同「組」。

【0097】 本文術語「結合親和力（binding affinity）」係指兩個分子（例如抗體或其片段，與抗原）之間非共價相互作用力之量測結果。術語「結合親和力」用於描述單價相互作用（固有活性）。

【0098】 兩個分子（例如抗體或其片段，與抗原）之間經由單價相互作用存在的結合親和力可藉由測定平衡解離常數（ K_D ）來定量。又， K_D 可藉由量測複合物形成及解離之動力學（例如藉由 SPR 方法）加以測定。對應於單價複合物之締合及解離的速率常數分別稱為締合速率常數 k_a （或 k_{on} ）及解離速率常數 k_d （或 k_{off} ）。 K_D 經由方程式 $K_D = k_d/k_a$ 而與 k_a 及 k_d 關聯。

【0099】 根據上述定義，可藉由比較個別抗體/抗原複合物之 K_D 值來比較與不同分子相互作用有關的結合親和力，諸如比較不同抗體對指定抗原的結合親和力。

【0100】 本發明之抗體可以 1×10^{-7} M 或小於 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M 或小於 1×10^{-8} M、或 1×10^{-9} M 或小於 1×10^{-9} M、或 1×10^{-10} M 或小於 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M 或小於 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或小於 1×10^{-12} M、或 1×10^{-13} M 或小於 1×10^{-13} M 之親和力（ K_D ）結合人類 TREM-1，如使用表面電漿子共振所測定。本發明之抗體可以 1×10^{-7} M 或小於 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M 或小於 1×10^{-8} M、或 1×10^{-9} M

或小於 1×10^{-9} M、或 1×10^{-10} M 或小於 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M 或小於 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或小於 1×10^{-12} M、或 1×10^{-13} M 或小於 1×10^{-13} M 之親和力 (K_D) 結合食蟹獼猴 TREM-1，如使用表面電漿子共振所測定。

【0101】 本文術語「結合特異性 (binding specificity)」係指分子 (諸如抗體或其片段) 與單一排他性抗原或與有限數目個高度同源抗原 (或抗原決定基) 的相互作用。相比之下，能夠特異性結合至 TREM-1 的抗體不能夠結合不相似的分子。本發明之抗體不能夠結合 Nkp44。

【0102】 相互作用之特異性及平衡結合常數值可藉由熟知方法直接測定。評估配位體 (諸如抗體) 結合其目標之能力的標準檢定在此項技術中已為人所知且包括例如 ELISA、西方墨點法 (Western blots)、RIA 及流動式細胞量測術分析。抗體之結合動力學及結合親和力亦可藉由此項技術中已知的標準檢定 (諸如 SPR) 加以評估。

【0103】 可執行競爭性結合檢定，其中將抗體對目標的結合與彼目標之另一種配位體 (諸如另一種抗體) 對該目標的結合進行比較。

【0104】 在另一態樣中，本發明提供包含本發明之分子 (諸如 TREM-1 抗體、本文所述之聚核苷酸、載體及細胞) 的組成物及調配物。舉例而言，本發明提供一種醫藥組成物，其包含連同醫藥學上可接受之載劑一起調配的一或多種本發明 TREM-1 抗體。

【0105】 因此，本發明之一個目標為提供一種醫藥調配物，其包含以 0.25 mg/ml 至 250 mg/ml 之濃度 (諸如 10 mg/ml 至 200 mg/ml 之濃度) 存在的此 TREM-1 抗體，且其中該調配物具有 2.0 至 10.0 之 pH 值，諸如 4.0 至 8.0 之 pH 值。調配物可進一步包含緩衝系統、防腐劑、張力劑、螯合劑、穩定劑及/或界面活性劑中的一或多種，以及其各種組合。防腐劑、等張劑、螯合劑、穩定劑及界面活性劑在醫藥組成物中的使用已為熟習此項技術者所熟知。可參考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版,

1995。

【0106】 在一個具體實例中，醫藥調配物為水性調配物。此調配物典型地為溶液或懸浮液，但亦可包括膠體、分散液、乳液及多相物質。術語「水性調配物 (aqueous formulation)」定義為包含至少 50% w/w 水的調配物。同樣，術語「水溶液 (aqueous solution)」定義為包含至少 50% w/w 水的溶液，且術語「水性懸浮液」定義為包含至少 50% w/w 水的懸浮液。

【0107】 在另一個具體實例中，醫藥調配物為經冷凍乾燥之調配物，在使用之前由醫師或患者向其中添加溶劑及/或稀釋劑。

【0108】 在另一態樣中，醫藥調配物包含此抗體之水溶液及緩衝液，其中該抗體存在的濃度為 1 mg/ml 或高於 1 mg/ml，且其中該調配物具有約 2.0 至約 10.0 之 pH 值。

【0109】 本發明之 TREM-1 抗體及包含此等抗體的醫藥組成物可用於治療發炎疾病，諸如以下：發炎性腸病 (IBD)、克羅恩氏病 (Crohn's disease, CD)、潰瘍性結腸炎 (UC)、大腸急躁症、類風濕性關節炎 (RA)、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡 (SLE)、狼瘡腎炎、I 型糖尿病、格雷夫氏病 (Grave's disease)、多發性硬化症 (MS)、自體免疫心肌炎、川崎氏病 (Kawasaki disease)、冠狀動脈病、慢性阻塞性肺病、間質性肺病、自體免疫甲狀腺炎、硬皮症、全身性硬化症、骨關節炎、異位性皮炎、白斑病、移植抗宿主疾病、休格連氏症候群 (Sjogren's syndrome)、自體免疫腎炎、古德帕斯徹氏症候群 (Goodpasture's syndrome)、慢性發炎性髓鞘脫失多神經病變、過敏症、哮喘及作為急性或慢性炎症之結果的其他自體免疫疾病。

【0110】 本發明之 TREM-1 抗體可適用於治療患有發炎性腸病的個體。發炎性腸病 (IBD) 為可影響自口腔至肛門之胃腸道的任何部分，從而引起多種症狀的疾病。IBD 主要引起腹痛、腹瀉 (可能出血)、嘔吐或體重減輕，但亦可引起胃腸道之外的併發症，諸如皮疹、關節炎、眼睛發炎、

疲勞及缺乏專注力。IBD 患者可分成兩大類：潰瘍性結腸炎（UC）患者及克羅恩氏病（CD）患者。CD 通常涉及迴腸及結腸，其可影響腸之任何區域，但經常為不連續的（疾病之病灶區域擴散遍及於整個腸中）。UC 總是涉及直腸（結腸）且較為連續。在 CD 中，發炎具有透壁性，導致膿腫、瘻管及狹窄，而在 UC 中，發炎典型地限於黏膜。對於克羅恩氏病尚無已知的醫藥或外科治癒措施，而患有 UC 的一些患者可藉由手術移除結腸來治癒。治療方案侷限於控制症狀、維持緩解及防止復發。臨床中於發炎性腸病中之功效可以針對 CD 之克羅恩氏病活動指數（CDAI）分數之降低加以度量，其為基於實驗室測試及生活品質問卷調查的評分量表。在動物模型中，功效主要係依據體重增加以及疾病活動指數（DAI）加以度量，疾病活動指數為糞便堅實度、體重與糞便含血之組合。

【0111】 本發明之 TREM-1 抗體可適用於治療患有類風濕性關節炎的個體。類風濕性關節炎（RA）為影響即使不是全身也幾乎是全身的全身性疾病且為關節炎之最常見形式之一。其特徵為關節發炎，引起疼痛、僵硬、溫熱、發紅及腫脹。此發炎為炎性細胞侵入關節的結果，且此等炎性細胞釋放可消化骨骼及軟骨的酶。結果，此發炎可引起嚴重的骨骼及軟骨損傷且引起關節惡化及嚴重疼痛，以及其他生理效應。所連累的關節會失去其形狀及準直，導致疼痛及運動能力喪失。

【0112】 此項技術中已知若干用於類風濕性關節炎的動物模型。舉例而言，在膠原蛋白誘發性關節炎（CIA）模型中，小鼠顯現的發炎性關節炎類似於人類類風濕性關節炎。由於 CIA 與 RA 共有相似的免疫學及病理學特徵，因此使得其成為適用於篩選潛在人類消炎化合物的模型。於此模型中之功效係依據關節腫脹之減輕來度量。臨床中於 RA 中之功效係依據減少患者症狀之能力來度量，其係以關節腫脹、紅血球沈降速率、C 反應蛋白含量及血清因子含量（諸如抗瓜胺酸化蛋白質抗體）之組合來度量。

【0113】 本發明之 TREM-1 抗體可適用於治療患有牛皮癬的個體。牛皮癬為 T 細胞介導之皮膚發炎病症，其可引起相當的不適。其為目前尚無治癒措施且影響所有年齡人的疾病。雖然患有輕度牛皮癬的個體經常可以局部藥劑控制其疾病，但全世界範圍內有超過一百萬患者需要紫外光治療或全身性免疫抑制療法。遺憾的是，紫外輻射之不便及風險以及許多療法之毒性限制其長期使用。此外，患者牛皮癬通常會復發且在一些情況下，在中止免疫抑制療法之後不久便反彈。最近開發之基於 CD4+ T 細胞轉移的牛皮癬模型模擬人類牛皮癬之許多態樣且因此可用於鑑別適用於治療牛皮癬的化合物（Davenport 等人, Internat. Immunopharmacol 2:653-672, 2002）。於此模型中之功效係使用評分系統、依據皮膚病變之減少來度量。類似地，於患者中之功效係依據皮膚病變之減少來度量。

【0114】 本發明之 TREM-1 抗體可適用於治療患有牛皮癬性關節炎的個體。牛皮癬性關節炎（PA）為發炎性關節炎之一種類型，其發生於牛皮癬患者之子集中。在此等患者中，皮膚病變/症狀伴隨著類似於類風濕性關節炎中所見的關節腫脹。其特徵為皮膚發炎之區域斑駁、鼓起、發紅，且具有鱗屑。牛皮癬經常影響肘及膝之頂端、頭皮、肚臍、及生殖器區域或肛門周圍。約 10%牛皮癬患者的關節亦顯現相關的發炎。

【0115】 如本文所用，術語「治療（treatment）」係指對有需要之任何人類或其他動物個體的醫學療法。該個體預期已經歷由醫學或獸醫學執業者進行的身體檢查，其已給予推測性或明確性診斷，指示使用該治療會有益於該人類或其他動物個體之健康。該治療之時間選擇及目的可根據許多因素（諸如個體健康現狀），因個體而異。因此，該治療可為預防性、緩解性、症狀性及/或治愈性治療。

【0116】 依據本發明，預防性、緩解性、症狀性及/或治愈性治療可代表本發明之各別態樣。

【0117】 本發明之抗體可非經腸投予，諸如靜脈內，諸如肌肉內，諸如皮下。或者，本發明之抗體可經由非注射（non-parenteral）途徑（諸如經口或局部）投予。本發明之抗體可預防性投予。本發明之抗體可治療性投予（在需要時）。

【0118】 例示性具體實例

【0119】 1.一種鑑別功能性 TREM-1 抗體之方法，包含（a）培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；（b）當該第一細胞與 TREM-1 調節劑一起培育時，量測該細胞之活性；（c）使（b）之培養物與 TREM-1 抗體接觸；及（d）測得該第一細胞之活性小於或大於（b）中所量測之活性。

【0120】 2.一種鑑別阻斷性 TREM-1 抗體之方法，包含（a）培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；（b）當該第一細胞與經活化之嗜中性白血球一起培育時，量測該細胞之活性；（c）使該第一細胞與經活化之嗜中性白血球之培養物與 TREM-1 抗體接觸；及（d）測得該第一細胞之活性小於（b）中所量測之活性。

【0121】 3.根據具體實例 1 至 2 中任一項之方法，其中（b）中之調節劑為經活化之嗜中性白血球或 TREM-1 配位體。

【0122】 4.一種鑑別刺激性 TREM-1 抗體之方法，包含（a）培養表現 TREM-1、信號傳導蛋白及報導構築體之第一細胞；（b）量測該第一細胞之活性；（c）使該細胞與 TREM-1 抗體接觸/一起培育；及（d）測得該第一細胞之活性大於（b）中所量測之活性。

【0123】 5.根據具體實例 1 至 4 中任一項之方法，其中該第一細胞來源於造血系統。

【0124】 6.根據具體實例 5 之方法，其中該來源於造血系統之細胞為骨髓細胞。

【0125】 7.根據具體實例 5 之方法，其中該來源於造血系統之細胞為 T 細胞。

【0126】 8.根據具體實例 1 至 7 中任一項之方法，其中該信號傳導蛋白為 DAP10。

【0127】 9.根據具體實例 1 至 7 中任一項之方法，其中該信號傳導蛋白為 DAP12。

【0128】 10.根據具體實例 1 至 7 中任一項之方法，其中該信號傳導蛋白為 TCR ξ 。

【0129】 11.根據具體實例 1 至 7 中任一項之方法，其中該信號傳導蛋白為 Fc γ RIII。

【0130】 12.根據具體實例 1 至 7 中任一項之方法，其中該信號傳導蛋白為 Fc 受體。

【0131】 13.根據具體實例 1 至 6 中任一項之方法，其中該報導構築體包含轉錄因子及報導基因。

【0132】 14.根據具體實例 13 之方法，其中該轉錄因子為 NFAT。

【0133】 15.根據具體實例 14 之方法，其中該轉錄因子為 NF κ B。

【0134】 16.根據具體實例 13 至 15 中任一項之方法，其中該報導基因編碼 β -半乳糖苷酶。

【0135】 17.根據具體實例 13 至 15 中任一項之方法，其中該報導基因編碼螢光素酶。

【0136】 18.根據具體實例 13 至 15 中任一項之方法，其中該報導基因編碼綠色螢光蛋白 (GFP)。

【0137】 19.根據具體實例 13 至 15 中任一項之方法，其中該報導基因為編碼氯黴素轉移酶的基因。

【0138】 20.一種鑑別阻斷性 TREM-1 抗體之方法，包含 (a) 培養表

現 TREM-1、DAP12 及編碼螢光素酶之基因的 T 細胞；(b) 當將該 T 細胞與經活化之嗜中性白血球一起培育時，量測該 T 細胞之發光；(c) 使 (b) 之共培養物與 TREM-1 抗體接觸；及 (d) 測得該 T 細胞之發光小於 (b) 中所量測之活性。

【0139】 21. 根據具體實例 7 之方法，其中該細胞為 BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T 細胞系。

【0140】 22. 一種抗體，其藉由具體實例 1 至 3 及 5 至 21 中任一項之方法鑑別。

● 【0141】 23. 一種抗體，其能夠特異性結合至 TREM-1 且能夠阻斷 TREM-1 功能。

【0142】 24. 根據具體實例 22 至 23 中任一項之抗體，其中該抗體能夠防止或減少 TREM-1 之二聚化/多聚化。

【0143】 25. 根據具體實例 22 至 24 中任一項之抗體，其中該抗體能夠阻斷 TREM-1 與其配位體之間的相互作用。

【0144】 26. 根據具體實例 22 至 25 中任一項之抗體，其中該抗體能夠阻斷 PGLYRP1 誘導之 TREM-1 功能。

● 【0145】 27. 根據具體實例 22 至 26 中任一項之抗體，其中該 TREM-1 為人類 TREM-1。

【0146】 28. 根據具體實例 27 之抗體，其中該抗體亦能夠特異性結合至來自除人類以外之另一物種之 TREM-1 及阻斷來自除人類以外之另一物種之 TREM-1 的功能。

【0147】 29. 根據具體實例 28 之抗體，其中來自另一物種之該 TREM-1 為食蟹獼猴 TREM-1。

【0148】 30. 根據具體實例 28 之抗體，其中來自另一物種之該 TREM-1 為恆河猴 TREM-1。

【0149】 31.根據具體實例 22 至 30 中任一項之抗體，其能夠特異性結合 K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 13)。

【0150】 32.根據具體實例 22 至 31 中任一項之抗體，其能夠特異性結合 A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 14)。

【0151】 33.根據具體實例 22 至 32 中任一項之抗體，其能夠特異性結合 A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 15)。

【0152】 34.根據具體實例 22 至 33 中任一項之抗體，其與 mAb 0170 競爭結合至人類 TREM-1。

【0153】 35.根據具體實例 22 至 34 中任一項之抗體，其與 mAb 0170 競爭結合至食蟹獼猴 TREM-1。

【0154】 36.根據具體實例 22 至 35 中任一項之抗體，其能夠特異性結合包含 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之胺基酸 D38 至 F48 之多肽，如利用例如 HX-MS 所測定。

【0155】 37.根據具體實例 22 至 36 中任一項之抗體，其具有包含以下之抗原決定基：選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 D38、V39、K40、C41、D42、Y43、T44 及 L45 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個或全部，及選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 E46、K47 及 F48 組成之群之胺基酸殘基中的 1 個、2 個或全部，如使用例如 HX-MS 所測定。

【0156】 38.根據具體實例 22 至 37 中任一項之抗體，其能夠特異性結合包含食蟹獼猴 TREM-1 之胺基酸殘基 E38 至 L45 的多肽，如使用例如 HX-MS 所測定。

【0157】 39.根據具體實例 22 至 38 中任一項之抗體，其具有至少包含選自由 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之 D42、E46、D92 及 H93 組成之群之胺基酸殘基的抗原決定基，如使用表面電漿子共振所測定。

【0158】 40.根據具體實例 22 至 39 中任一項之抗體，其具有至少包含 SEQ ID NO: 1（人類 TREM-1）之胺基酸殘基 E46 及/或 D92 的抗原決定基，如使用表面電漿子共振所測定。

【0159】 41.根據具體實例 22 至 40 中任一項之抗體，其中該抗體能夠特異性結合人類 TREM-1 之 (i) 至少一個選自由 A21、T22、K23、L24、T25、E26 組成之群的胺基酸殘基，及 (ii) 至少一個選自由以下組成之群的胺基酸殘基：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，及 (iii) 至少一個選自由 C113、V114、I115、Y116、Q117、P118 及 P119 組成之群的胺基酸殘基。

【0160】 42.根據具體實例 22 至 40 中任一項之抗體，其中該抗體能夠特異性結合 (i) 至少一個選自由以下組成之群的胺基酸殘基：V39、K40、C41、D42、Y43、T44、L45、E46、K47、F48、A49、S50、S51、Q52、K53、A54、W55、Q56，及 (ii) 至少一個選自由以下組成之群的胺基酸殘基：T70、E71、R72、P73、S74、K75、N76、S77、H78、P79、V80、Q81、V82、G83、R84、I85，及 (iii) 至少一個選自由 C113、V114、I115、Y116、Q117、P118 及 P119 組成之群的胺基酸殘基。

【0161】 43.根據具體實例 22 至 42 中任一項之抗體，其重鏈包含對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸殘基 101 至 110（DMGIRRQFAY）的 CDRH3 序列，其中該等胺基酸殘基中的 1 個、2 個或 3 個可經不同胺基酸取代。

【0162】 44.根據具體實例 22 至 42 中任一項之抗體，其重鏈包含對應於 SEQ ID NO: 6 之胺基酸殘基 101 至 110（DMGQRRQFAY）的 CDRH3 序列，其中 1 個、2 個或 3 個胺基酸殘基可經不同胺基酸取代。

【0163】 45.根據具體實例 43 至 44 中任一項之抗體，進一步包含對

應於 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 之胺基酸殘基 31 至 35 (TYAMH) 的 CDRH1 序列，其中此等胺基酸殘基之一可經不同胺基酸殘基取代；及/或對應於 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 50 至 68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) 的 CDRH2 序列，其中該等胺基酸中之 1 個、2 個或 3 個可經不同胺基酸殘基取代。

【0164】 46.根據具體實例 43 至 45 中任一項之抗體，其輕鏈包含：對應於 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸殘基 24 至 38 (RASESVDTFDYSFLH) 的 CDRL1 序列，其中此等胺基酸殘基中之 1 個、2 個或 3 個可經不同胺基酸取代；及/或對應於 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸殘基 54 至 60 (RASNLES) 的 CDRL2 序列，其中此等胺基酸殘基中之 1 個或 2 個可經不同胺基酸取代；及/或對應於 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 之胺基酸殘基 93 至 101 (QQSNEDPYT) 的 CDRL3 序列，其中此等胺基酸殘基中之 1 個或 2 個可經不同胺基酸取代。

【0165】 47.根據具體實例 43 至 46 中任一項之抗體，包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 及/或 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7。

【0166】 48.根據具體實例 22 至 47 中任一項之抗體，其以 1×10^{-7} M 或小於 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M 或小於 1×10^{-8} M、或 1×10^{-9} M 或小於 1×10^{-9} M、或 1×10^{-10} M 或小於 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M 或小於 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或小於 1×10^{-12} M、或 1×10^{-13} M 或小於 1×10^{-13} M 之結合親和力 (K_D) 結合人類 TREM-1，如使用表面電漿子共振所測定。

【0167】 49.根據具體實例 48 之抗體，其中該結合親和力 (K_D) 為 1×10^{-10} M 或小於 1×10^{-10} M。

【0168】 50.根據具體實例 22 至 49 中任一項之抗體，其以 1×10^{-7} M 或小於 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M 或小於 1×10^{-8} M、或 1×10^{-9} M 或小於 1×10^{-9} M、或 1×10^{-10} M 或小於 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M 或小於 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或小於 1×10^{-12} M、

或 1×10^{-13} M 或小於 1×10^{-13} M 之結合親和力 (K_d) 結合食蟹獼猴 TREM-1，如使用表面電漿子共振所測定。

【0169】 51.根據具體實例 50 之抗體，其中該結合親和力為 1×10^{-9} M 或小於 1×10^{-9} M。

【0170】 52.根據具體實例 22 至 51 中任一項之抗體，其為 IgG。

【0171】 53.根據具體實例 22 至 52 中任一項之抗體，其係用作藥劑。

【0172】 54.根據具體實例 22 至 53 中任一項之抗體，其用於治療自體免疫疾病及/或慢性炎症。

【0173】 55.根據具體實例 22 至 52 中任一項之抗體，其用於製備供治療自體免疫疾病及/或慢性炎症用的藥劑。

【0174】 56.一種治療自體免疫疾病及/或慢性炎症的方法，包含向有需要的個體投予根據具體實例 22 至 52 中任一項之抗體。

【0175】 57.根據具體實例 53 至 55 中任一項之用途或根據具體實例 56 之方法，其中該自體免疫疾病為類風濕性關節炎。

【0176】 58.根據具體實例 53 至 55 中任一項之用途或根據具體實例 56 之方法，其中該自體免疫疾病為克羅恩氏病。

【0177】 59.根據具體實例 53 至 55 中任一項之用途或根據具體實例 56 之方法，其中該自體免疫疾病為潰瘍性結腸炎。

【0178】 60.根據具體實例 53 至 55 中任一項之用途或根據具體實例 56 之方法，其中該自體免疫疾病為牛皮癬性關節炎。

【0179】 本發明藉由以下實施例進一步說明，該等實施例不應視為進一步限制。本申請案中所引述之所有數字及所有參考文獻、專利及已公開之專利申請案的內容係以引用的方式明確併入本文中。

【0180】 實施例

【0181】 實施例 1：BWZ.36 人類 TREM-1:DAP12 穩定細胞系的產生

【0182】 BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ 細胞系（本文中亦稱為「BWZ/hTREM-1 報導細胞」）來源於 BW5147 T 細胞（小家鼠胸腺淋巴瘤細胞系，ATCC TIB-47，LGC Standards, Middlessex, UK）且含有受 NFAT 啟動子元件之四個複本調控的 LacZ 報導構築體（參見 Karttunen, J. 及 Shastri, N. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3972-3976；及 Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. 及 Herzenberg, L. A. (1990) Genes Dev. 4, 1823-1834）。使用 Superfect 轉染試劑（目錄號 301305，Qiagen Nordic, Denmark）將 TREM/DAP12/pMX-IRES 載體（編碼 786 bp 之 TREM-1（自 SmaI 位點至 BamHI 位點），使用 TREM-1 cDNA（基因庫參考 ID：NM_018643.2，Sino Biological 公司，Beijing, China）作為模板且使用寡核苷酸 5' TAGTAGGGATCCGCTGGTGCACAGGAAGG（SEQ ID NO: 16）及 5' TAGTAGGCGCCGCTTCGTGGGCCTAGGGTAC（SEQ ID NO: 17）作為引子選殖入 pIRESHyg 載體（GenBank 寄存編號 U89672）（目錄號 6061-1，Clontech Laboratories, CA, USA）中）轉染於 PLAT-E 封裝細胞系（由 W. Yokoyama, Washington University；或者 Cell Biolabs 公司（目錄號 RV-101），Bio-Mediator KY, Vantaa, Finland 提供）中。使用含有 TREM/DAP12/pMX-IRES 病毒粒子的 PLAT-E 上清液如下感染 BWZ.36 細胞：2×10⁵ 個 BWZ.36 細胞於 6 孔盤中培養且培養基用 1.5 ml 含有病毒粒子+8 mg/ml 凝聚胺（polybrene）的上清液置換。6 至 8 小時之後，向培養盤中添加 1.5 ml 常規培養基且細胞另培育 24 小時。穩定表現 TREM-1 的 BWZ.36 細胞系經抗 TREM-1 單株抗體（純系 21C7）染色且藉由細胞分選術加以分離。

【0183】 實施例 2：培養 BWZ.36 人類 TREM-1:DAP12 穩定細胞系

【0184】 BWZ/hTREM-1 報導細胞於具有/不具有酚紅之 RPMI 1640（目錄號 11835，Gibco, Carlsbad CA, USA）中培養，該具有/不具有酚紅之 RPMI 1640 補充有 10% FCS（目錄號 16140-071，Gibco, New York, USA）、1%青黴

素/鏈黴素(目錄號 15070-06, Gibco)、1 mM 丙酮酸鈉(目錄號 11360, Gibco)、5 μ M -2ME(目錄號 31350-010, Gibco)及 2 mM L-麩醯胺酸(目錄號 25030, Gibco)。不需要特別的培養盤或塗佈。添加 10 ml 維爾烯 (Versene) (目錄號 15040, Gibco) 以分離細胞, 接著轉移至管中, 1200 rpm 離心 5 分鐘且於新鮮的具有/不具有酚紅之 RPMI 1640 中洗滌。此等細胞接著即可用於檢定中或再培養以便進一步增殖。

【0185】 實施例 3: 小鼠免疫及鑑別 mAb

【0186】 爲了產生結合人類 TREM-1 的抗體, 用人類(h) TREM-1(SEQ ID NO: 1)、表現 hTREM-1 之細胞 (BWZ.36 細胞) 或兩者之組合使野生型 Balb/C 小鼠與 TREM-1 基因剔除 (KO) 小鼠 (C57BL/6 背景) 均免疫。藉由直接 ELISA, 用 hTREM-1 蛋白進行初次篩選, 或藉由 FMAT, 使用表現 hTREM-1 之 BWZ.36 細胞進行初次篩選。二次篩選係藉由流動式細胞量測術、用表現 hTREM-1 之 HEK293 細胞進行。接著在實施例 4 中所述的 BWZ/hTREM-1 報導體檢定中篩選陽性融合瘤上清液。

【0187】 自以 hTREM-1 蛋白免疫 (六次, 間隔時間爲兩週, 隨後爲加強注射) 之 KO 小鼠獲得數目最多的阻斷性抗體。分離得到總計逾 200 種 hTREM-1 抗體, 隨後發現其中約 70 種具有阻斷作用。

【0188】 所有 TREM-1 特異性融合瘤上清液在 BWZ/hTREM-1 報導體檢定中首先以上清液形式加以測試, 且隨後以純化抗體形式 (作爲可溶性抗體與盤結合型抗體, 自 5000 ng/ml 充分滴定至 7 ng/ml) 加以測試。使用多位不同供者的血液作爲新鮮嗜中性白血球來源。舉例而言, 圖 4 顯示來自一種融合物之抗體, 其中報導體檢定中作爲阻斷活性的活性示於 x 軸上且抗體爲盤結合型抗體時的促效活性示於 y 軸上。

【0189】 實施例 4: PGLYRP1 鑑別爲受嗜中性白血球表現的 TREM-1 配位體

【0190】 PGLYRP1 經使用免疫沈澱法聯合質譜分析法 (IP-MS) 鑑別為 TREM-1 配位體。使用可溶性 TREM-1 四聚體作為鑑別配位體的親和性「誘餌」分子。簡言之，TREM-1 四聚體-Fc (SEQ ID NO: 2) 及 CD83-Fc (SEQ ID NO: 5) 分別各以 100 μ g/ml 之最終濃度與藉由如上文所述之聚葡萄糖沈降法純化的 2.7 億個人類嗜中性白血球在 1 mL PBS 中，在 4°C 及輕緩震盪下培育 90 分鐘。在此等細胞集結之後，將細胞以 2 mM 之濃度再懸浮於 1 mL 包含交聯劑 3,3'-二硫基雙[磺基丁二醯亞胺丙酸酯] (DTSSP) (Thermo Scientific: 21578, Rockford, IL, USA) 的 PBS 緩衝液中且在室溫下培育 30 分鐘。細胞用 1 mL PBS 洗滌 3 次，隨後於 1 mL RIPA 緩衝液 (Thermo Scientific, 89901, Rockford, IL, USA) 中溶解。溶胞物在 4°C 下以 15,000 X g 離心 10 分鐘以移除不溶性物質。使用蛋白質 A Mag Sepharose™ 珠粒 (GE Healthcare Life Sciences, 28-9670-56, Piscataway, NJ, USA) 使與 Fc 偶合探針交聯的嗜中性白血球蛋白自上清液中免疫沈澱。簡言之，50 μ L 珠粒首先用 200 μ L PBS 洗滌，接著再懸浮於 1 mL 細胞溶胞液中，在 4°C 下培育 60 分鐘，經磁力捕捉，且依序用 200 μ L RIPA 緩衝液洗滌 2 次，接著用 200 μ L PBS 洗滌 3 次。自最後磁力捕捉物移除 PBS 之後，使用含有 8 M 尿素、100 mM Tris (pH 8.0) 及 15 mM TCEP (Thermo Scientific, 77720, Rockford, IL, USA) 的 200 μ L 緩衝液溶離磁性珠粒上的蛋白質且在室溫下培育 30 分鐘，捕捉珠粒且將上清液轉移至 Microcon Ultracel YM-30 過濾器 (Millipore, 42410, Billerica, MA, USA) 中。樣品在 20°C 以 14,000 x g 離心 30-60 分鐘，直至濾膜之頂部無液體殘留。所滯留之蛋白質接著在室溫下，在黑暗中用 100 μ L 含於 8 M 尿素中的 50 mM IAA (碘乙醯胺) 烷基化 30 分鐘。過濾器用 100 μ L 50 mM NH_4HCO_3 洗滌 2 次且接著轉移至新收集管中。添加含有 1 μ g 胰蛋白酶 (Promega, V5111, Madison, WI) 的 60 μ L 50 mM NH_4HCO_3 ，隨後在 37°C 培育隔夜。藉由以 14,000 x g 離心 30 分鐘、隨後用 50 μ L 50 mM NH_4HCO_3 洗滌過濾器來

收集胰蛋白酶消化物。使用 LTQ-Orbitrap-XL 質譜儀 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 藉由 LC/MS/MS 分析 10 μ L 消化物。針對 IPI 人類資料庫 (3.81 版本), 使用 SEQUEST-Sorcerer 引擎 (4.0.4 版本) (SageN, Milpitas, CA, USA) 搜尋資料且接著用 Scaffold 3 (Proteome Software, Portland, OR, USA) 進行後處理以過濾錯誤發現率 (false discovery rate) 為 1% 的蛋白質 ID。減去陰性對照之後, 發現 PGLYRP1 為與 hTREM-1 四聚體特異性締合的高置信蛋白質。嗜中性白血球之免疫沈澱顯示, 在 148 種所鑑別的蛋白質中, 72 種蛋白質由單獨對照構築體 (CD83) 免疫沈澱, 73 種蛋白質對 TREM-1 與對 CD83 相同, 而僅 3 種具有 TREM-1 特異性 (圖 3)。隨後使用來自不同供者的嗜中性白血球重複實驗且再次鑑別 PGLYRP1 與 hTREM-1 特異性相互作用。

【0191】 實施例 5：大腸桿菌所表現之人類 PGLYRP1 之再摺疊及純化

【0192】 人類 PGLYRP1 以包涵體形式於大腸桿菌 BL21 (DE3) 細胞中表現。細菌藉由離心收集, 再懸浮於 50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% Triton X-100 中且藉由音波處理加以分裂。不溶性集結粒用 50 mM Tris pH 8.0、1% Triton X-100、2 M 尿素洗滌三次且用 50 mM Tris pH 8.0 洗滌一次, 接著溶解於 50 mM Tris-HCl、6 M 鹽酸胍 pH 7.4、1 mM DTT (最終蛋白質濃度 20 mg/ml) 中。對於試管內摺疊而言, 將所溶解的人類 PGLYRP1 包涵體於 50 mM Tris pH 8.0、2 mM EDTA、5 mM 半胱胺、0.5 mM 胱胺、0.4 M 精胺酸中稀釋 (最終蛋白質濃度 1 mg/ml)。在 4°C 隔夜之後, 摺疊混合物藉由離心/過濾澄清且接著於 10 mM MES pH 3.5 中稀釋 12 倍以降低電導率及 pH 值 (最終 pH 值約 5.8, 電導率約 6 mS/cm)。所稀釋之摺疊混合物接著施加於 Hitrap SP HP 5 ml 管柱 (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 上, 隨後用 50 mM MES pH 5.8、以 5 個管柱體積進行洗滌。所結

合的人類 PGLYRP1 接著用 0-60%線性梯度之 50 mM MES pH 5.8、1 M NaCl、以 20 個管柱體積溶離。將含有再摺疊之人類 PGLYRP1 的溶離份彙集且藉由 Amicon ultra 15 離心裝置(UFC800324 3,000 kDa MWCO, Millipore, Hellerup, Denmark)濃縮至小於 4 ml。接著使用 Hiload 26/60 Superdex 75 318 ml 管柱 (17-1070-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden)純化及使蛋白質相對於磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 進行緩衝交換。大部分再摺疊人類 PGLYRP1 蛋白呈單體形式。濃縮之後，藉由 NANODROP UV 光譜儀量測 280 nm 吸光度來測定最終蛋白質濃度。藉由十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 評估蛋白質純度。

【0193】 實施例 6：建立 TREM-1 反應性報導體檢定

【0194】 TREM-1 報導細胞系係藉由用 NFAT-LacZ 報導構築體以及 hTREM-1 及 DAP12 轉染 BWZ.36 細胞系 (如實施例 1 中所述) 來產生。藉由聚葡萄糖沈降法純化健康供者之嗜中性白血球。血液在 FicollPaque (17-0840-03, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 上梯度分層 (在 50 ml 管中, 3 份 Ficoll 及 4 份血液之比率), 接著在 22°C 以 400xg 離心 30 分鐘而不制動。中間 PBMC 帶藉由抽吸平緩地移除。將在所包裝之 RBC 上分層的嗜中性白血球吸出且轉移至 50 ml 聚丙烯管中。嗜中性白血球及污染性 RBC 用 1xPBS 稀釋至 40 ml 且隨後添加 10 ml 4% DEXTRAN 500 (Sigma, 31392, St Louis, MO, USA) 之 PBS 溶液。藉由輕緩倒置進行混合之後, 將管在 22°C 擱置 20-30 分鐘。接著將富含粒細胞的上清液轉移至新管中且在 22°C 以 250 x g 離心 5 分鐘; 吸出上清液且丟棄。污染性 RBC 經滲透性溶胞而移除, 簡言之, 將細胞集結粒再懸浮於 7.5 ml 0.2% NaCl 中; 輕緩混合 55-60 秒且添加 17.5 ml 1.2% NaCl 溶液。接著用 PBS 使體積達到 50 ml 且以 250 x g 離心 5 分鐘, 集結粒再懸浮於 7.5 ml 0.2% NaCl 中, 以再次重複溶胞。將最終粒細胞集結粒再懸浮於 RPMI/10% FBS 中。此等嗜中性白血球用 PGN (InVivogen, tlr1-pgnsa,

SanDiego, CA, USA)刺激隔夜以產生能夠刺激 TREM-1 的經活化之嗜中性白血球。接著以報導細胞:嗜中性白血球之 1:3 比率向 PGN 活化之嗜中性白血球培養物中添加 BWZ/hTREM-1 報導細胞。可使用由 PGLYRP1 (SEQ ID NO: 23) 及 PGN 組成的 TREM-1 配位體複合物替代經活化之嗜中性白血球來刺激 TREM-1。在經聚-D-離胺酸塗佈之黑色細胞培養盤 (編號 356640, 購自 BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 中進行檢定。培養 24 小時之後, 使用 BetaGlo 試劑 (E4720, 購自 Promega, Madison, WI, USA) 讀取 TREM-1 活化且使用 Perkin Elmer 之 TopCount 發光計數器量測發光。作為陽性對照, 可藉由能夠促效 TREM-1 的盤結合型 TREM-1 抗體 (R&D MAB1278, Minneapolis, MN, USA) 活化 TREM-1。培養盤用同型對照物或 TREM-1 抗體 MAB1278 ($3 \mu\text{g/ml}$, 於 PBS 中, 100 微升/孔) 在冷凍機中塗佈隔夜或在 37°C 、5% CO_2 下塗佈 2 小時, 隨後添加 BWZ/hTREM-1 報導細胞。培育 6-24 小時之後, 可使用 BetaGlo 試劑 (E4720, 購自 Promega, Madison, WI, USA) 讀取 TREM-1 活化且使用 Perkin Elmer 之 TopCount 發光計數器量測發光。此 BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ 細胞系 (「BWZ/hTREM-1 報導細胞」) 對抗體介導之 TREM-1 交聯顯示高反應性, 當用 $1-10 \mu\text{g/ml}$ 盤結合型市購抗 TREM-1 抗體刺激時, 對 NFAT 驅動之 LacZ 產生的誘導作用為同型對照的約 40 倍 (圖 1)。用單獨 toll 樣受體混合液 (tlrl-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich Denmark) (BWZ+TLR) 刺激時, 未觀測到信號增強。此外, 未活化的嗜中性白血球不能刺激 TREM-1, 而經 TLR 促效劑混合液 (tlrl-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich Denmark) 活化的嗜中性白血球可刺激 BWZ/hTREM-1 報導細胞。

【0195】 下表 1 顯示, 本文揭示之 TREM-1 抗體在此 BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定中能夠阻斷配位體誘導之 TREM-1 活化。

【0196】 表 1

抗體	發光×10E6
BWZ+經活化之嗜中性白血球	8.8
MAB1278	10
HPA	7.9
TREM26	9.9
TREM37	6.1
14F128	0.3
14F69	0.4
14F116	0.7
14F11	0.4
14F113	0.3

【0197】 所測試之市購抗體：MAB1278（目錄號 MAB1278，R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA）、抗 TREM-1 HPA（目錄號 HPA005563，Sigma, St Louis, MO, USA）、TREM26（目錄號 314902，Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）及 TREM37（目錄號 316102，Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）皆不能阻斷 TREM-1 信號。

【0198】 實施例 7：使用 HX-MS 進行的抗原決定基定位

【0199】 材料

【0200】 所用蛋白質批料為：

【0201】 hTREM-1：人類重組 TREM-1，非糖基化，於大腸桿菌中產生（目錄號 PRO-457，ProSpec-Tany TechnoGene 有限公司, Rehovot, Israel）。

【0202】 表 2：所用 mAb

抗體	供應商
mAb 0023	-
mAb 0024	-
mAb 0025	-
mAb 0026	-
MAB1278	RnD Systems
TREM26	BioLegend

【0203】 實驗之前，所有蛋白質皆相對於 PBS pH 7.4 進行緩衝交換。

【0204】 方法：HX-MS 實驗

【0205】 儀器及資料記錄

【0206】 HX 實驗藉由 LeapShell 軟體 (Leap Technologies 公司) 操作的 Leap 自動儀器 (H/D-x PAL; Leap Technologies 公司) 自動操作, 其執行氬交換反應之起始、反應時間控制、中止反應、注射於 UPLC 系統上及消化時間控制。Leap 自動儀器裝備有兩個溫度控制堆疊, 其分別維持在 20°C 用於儲存緩衝液及 HX 反應以及維持在 2°C 用於儲存蛋白質及中止溶液。Leap 自動儀器此外含有在 1°C 冷卻的 Trio VS 裝置 (Leap Technologies 公司), 該裝置容納前置管柱及分析管柱以及胃蛋白酶管柱、LC 管及切換閥。Trio VS 裝置之切換閥已自 HPLC 升級至 Microbore UHPLC 切換閥 (Cheminert, VICI AG)。對於管線內胃蛋白酶消化, 裝載 100 μ l 含有 200 pmol hTREM-1 的中止樣品且使用 200 μ L/min 之等濃度流速 (0.1%甲酸:CH₃CN 95:5) 通過 Poroszyme® 固著胃蛋白酶筒柱 (2.1×30 mm (Applied Biosystems))。所得肽截留且脫鹽於 VanGuard 前置管柱 BEH C18 1.7 μ m (2.1×5 mm (Waters 公司)) 上。隨後, 切換閥以將前置管柱定位成與分析管柱 UPLC-BEH C18 1.7 μ m (2.1×100 mm (Waters 公司)) 串聯, 且使用 9 分鐘 15-35% B 梯度 (以 200 μ l/min 自 AQUITY UPLC 系統 (Waters 公司) 遞送) 分離肽。移動相由 A: 0.1% 甲酸及 B: 0.1% 甲酸/CH₃CN 組成。使用 Q-TOF Premier MS (Waters 公司), 以正離子模式獲得 ESI MS 資料, 及依據 MS/MS 擷取 (CID) 及高能 (MS^E) 實驗的各別資料。使用白胺酸-腦啡肽作為鎖定質量 ([M+H]⁺ 離子, m/z 556.2771) 且以連續模式收集資料 (關於配置之進一步描述, 參見 Andersen 及 Faber, Int. J. Mass Spec., 302, 139-148 (2011))。

【0207】 資料分析

【0208】 在各別實驗中使用標準 CID MS/MS 或 MS^E 方法 (Waters 公司) 鑑別出胃酶解肽。使用 BiopharmaLynx 1.2 (017 版本) 處理 MS^E 資料。使用 MassLynx 軟體及內部 MASCOT 資料庫分析依據 CID 資料的 MS/MS 擷取。

【0209】 對 HX-MS 原始資料文檔進行連續性鎖定質量校正。使用原型定製軟體（HDX 瀏覽器，Waters 公司）及 HX-Express ((β 版本)；Weis 等人, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 1700 (2006)) 進行資料分析，亦即，氘化肽之質心確定及交換曲線之作圖。所有資料亦目視評估以確保僅解析之肽同位素包膜經受分析。

【0210】 抗原決定基定位實驗

【0211】 藉由在 mAb 存在或不存在下、在相應氘化緩衝液（亦即於 D₂O 中製備之 PBS，最終 96% D₂O，pH 7.4（未校正的值））中將 hTREM-1 稀釋 6 至 8 倍來起始醯胺氘/氘交換（HX）。所有 HX 反應皆在 20°C 進行且在 4 μ M mAb 不存在或存在下含有 4 μ M hTREM-1，從而得到 2 倍莫耳濃度過量的 mAb 結合位點。以 10 秒至 10000 秒的適當時間間隔，用 50 μ l 冰冷中止緩衝液（1.35 M TCEP）中止 HX 反應物之 50 μ l 等分試樣，使得最終 pH 值為 2.5（未校正的值）。

【0212】 結果及論述

【0213】 此實驗係對針對 hTREM-1 之 mAb 0023、0024、0025、0026 及市購 mAb MAB1278（RnD Systems）及純系 26（Biolegend）之抗原決定基進行定位。在 8 種不同 mAb 不存在或存在下，對 43 種肽（涵蓋 hTREM-1 之初級序列之 94%）之 HX 時程監測 10 至 10000 秒。

【0214】 在較早時間點（例如<300 秒）觀測到之交換保護作用與表面暴露之醯胺質子有關且從而亦與蛋白質界面有關。相比之下，在時程後期觀測到之作用與醯胺氘緩慢交換有關且從而與蛋白質之結構核心有關。因此，抗原決定基作用出現於較早時間點，而結構穩定化作用顯現為後期時間點之交換減少（Garcia, Pantazatos 及 Villareal, Assay and Drug Dev. Tech. 2, 81 (2004)；Mandell, Falick 及 Komives, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14705 (1998)）。

【0215】 在指定 mAb 存在或不存在下在較早時間點觀測到之交換模式可分成兩個不同類別：一類肽顯示不受 mAb 結合影響的交換模式。相比之下，hTREM-1 中之另一類肽在 mAb 結合時顯示保護作用而免於交換。舉例而言，在與 D₂O 交換 100 秒時，mAb 0023 之區域 Y111-F126 中，約 2 個以上醯胺被保護而免於交換。顯示此等保護作用的區域指定為抗原決定基區域。

【0216】 *mAb 0023 及 0026 之抗原決定基定位*

【0217】 mAb 0023 與 0026 均誘導 hTREM-1 之交換特徵發生相同改變且在此一併描述。在 0023/0026 結合時顯示保護作用的區域包括涵蓋殘基 T22-L96 及 Y111-D127 的肽。然而，藉由比較各肽在結合 mAb 0023/0026 時內部之交換保護作用之相對量及抗原決定基作用在肽 T25-F48、R84-Q112 及起始於 P118 之肽中之缺乏，可將抗原決定基範圍縮小至殘基 A21-E26、A49-I85 及 C113-P119。雖然在序列中相隔較遠，但此等區域在 hTREM-1 之 3D 結構中較近。

【0218】 *mAb 0024 及 Biolegend 純系 26 之抗原決定基定位*

【0219】 來自 Biolegend 之 mAb 0024 與純系 26 均誘導 hTREM-1 之交換特徵發生相同改變且在此一併描述。在 mAb 0024 結合時顯示保護作用的區域包括涵蓋殘基 V101-Q112 的肽。藉由比較各肽在結合 mAb 0024 時其內部之交換保護作用之相對量及在周圍肽中抗原決定基作用之缺乏，可將抗原決定基範圍縮小至殘基 Q104-Q112（圖 7B）。

【0220】 *NNC mAb 0025 之抗原決定基定位*

【0221】 在 0025 結合時顯示保護作用的區域包括涵蓋殘基 D38-M63、T70-L96 及 Y111-D127 的肽（圖 7C）。然而，藉由比較各肽在結合 0254-0025 時內部之交換保護作用之相對量及抗原決定基作用在周圍區域之肽中的缺乏，可將抗原決定基範圍縮小至殘基 V39-Q56、T70-I85 及

C113-P119。儘管在序列中相隔較遠，但此等區域在 hTREM-1 之 3D 結構中較近（圖 8）。

【0222】 *MAB1278 之抗原決定基定位*

【0223】 在 MAB1278 結合時顯示保護作用的區域包括涵蓋殘基 T70-L96 及 V101-Q112 的肽（圖 7D）。然而，藉由比較各肽在結合 MAB1278 時內部之交換保護作用之相對量及抗原決定基作用在周圍區域之肽中的缺乏，可將抗原決定基範圍縮小至殘基 T70-I85 及 Q104-Q112。雖然在序列中相隔較遠，但此等區域在 hTREM-1 之 3D 結構中較近。

【0224】 mAb 0023/0026 及 mAb 0025 之抗原決定基之結構位置顯示於圖 7A 中。mAb 0023 及 0026 之抗原決定基似乎主要存在於 hTREM-1 晶體結構二聚體之二聚體界面之 β 片中。此等 mAb 之拮抗作用可為防止 hTREM-1 二聚化及因此進行信號傳導的結果。

【0225】 實施例 8：TREM-1 與 mAb 0170 之間相互作用界面的確定

【0226】 對重組人類 TREM-1 與食蟹獼猴 TREM-1（分別為 hTREM-1 及 cTREM-1）進行抗原決定基定位。此實施例中所用的 hTREM-1 構築體包含殘基 M1-H140 (SEQ ID NO: 18) 且 cTREM-1 構築體包含殘基 M1-R180 (SEQ ID NO: 12)，其中向 C 端添加六個組胺酸殘基且使用野生型 hTREM-1 之胺基酸編號。在此實施例中，cTREM-1 之胺基酸係根據 hTREM-1 中之類似殘基編號，如圖 11 中所說明。若殘基編號為 58 或小於 58，則此實施例中所用之編號可藉由減去 19 來轉換為 SEQ ID NO: 12 中之編號，且若殘基編號為 60 或大於 60，則此實施例中所用之編號可藉由減去 20 來轉換為 SEQ ID NO: 12 中之編號。舉例而言，此實施例中之 cTREM-1 上之殘基編號 E46 對應於 SEQ ID NO: 12 中之殘基（ $46-19=27$ ）E27。此實施例中之 cTREM-1 上之殘基編號 L96 對應於 SEQ ID NO: 12 中之殘基（ $96-20=76$ ）L76。

【0227】 TREM-1 單獨或在 mAb 0170 存在下的溶液於 97% 氘化 hepes

緩衝液（20 mM hepes，150 mM 氯化鈉，pH 7.4）中稀釋 25 倍。非氘化對照物係藉由於質子化 hepes 緩衝液中稀釋來製備。氫交換實驗係在 waters HDX nanoAcquity 超高效液相層析（UPLC）系統（Waters 公司, Milford, MA, USA）上進行，該系統包括用於自動化樣品製備的 HD-x PAL 自動取樣器（LEAP Technologies 公司, Carrboro, NC, USA）。LC 管、前置管柱及分析管柱及切換閥位於冷卻至 0.3°C 的腔室中。胰蛋白酶消化管柱在 15°C 儲存。氫交換反應在 20°C 進行。質譜分析係使用 Waters SYNAPT G2 HDMS 質譜儀線上進行。

【0228】 在 120 pmol mAb 0170 存在或不存在下含有 100 pmol 人類或食蟹獼猴 TREM-1（1.54-1.98 μ l）的體積於氘化 hepes 緩衝液中稀釋至最終體積為 50 μ l。以適當的時間間隔，將整個體積轉移至且中止於 50 μ l 1.35 mM 參(2-羧乙基)膦（經調節至 pH 2.4 且保持在 3°C）中。立即注射 99 μ l 中止溶液且通過 Porozyme 固著胃蛋白酶管柱（2.1 mm $\times$ 30 mm）（Applied Biosystems, Life Technologies 公司, Carlsbad, CA, USA）且截留於 Waters VanGuard BEH C18 1.7 μ m（2.1 mm $\times$ 5 mm）管柱上（流速為 100 μ l/min，使用 5% (vol/vol) 甲醇及 0.1% 甲酸移動相）。在 Waters UPLC BEH C18 1.7 μ m（1.0 mm $\times$ 100 mm）管柱上，使用 10-40% 乙腈梯度（含有 0.1% 甲酸）、以 40 μ l/min 流速分離肽。

【0229】 質譜儀係以正離子模式（啟動離子遷移性分離）操作。電噴霧條件為 3.2 kV 毛細管，25 V 樣品錐，及 4 V 萃取錐偏移，850 ml/min 流速之氮氣脫溶劑氣體（加熱至 350°C）及 50 ml/min 錐氣流速。源塊加熱至 120°C。鎖定質量校正資料係使用作為參考化合物之白胺酸-腦啡肽之 1+離子（ m/z 556.2771）獲得且在資料分析期間應用。為了鑑別肽，使用 6 V（低能）及 50 V（高能）之阱碰撞偏移來進行 MS^E 類型實驗。僅使用 6 V 低能阱碰撞偏移來分析氘化樣品。關於其他細節，參見 Andersen, M.D., Faber, J.H., *Int. J. Mass Spectrom.* (2011), 302, 139-148。

【0230】 使用 Waters ProteinLynx Global Server 2.5 分析 MS^E 資料且鑑別 hTREM-1 肽涵蓋 80%蛋白質序列（表 3）且鑑別 cTREM-1 肽涵蓋 100%蛋白質序列（表 4）。使用自動應用鎖定質量校正且測定各肽中之氘結合度的 Waters DynamX 1.0 分析 HX-MS 資料文檔。另外，人工檢查所有資料以確保氘結合之恰當峰值分配及計算。

【0231】 結果

【0232】 肽及其交換模式之清單提供於表 3 中。

【0233】 當 mAb 0170 結合 hTREM-1 時，在涵蓋 A21 至 L96 序列之肽中觀測到防止交換的保護作用且因此確定抗原決定基位於此區域內。考慮到在 mAb 0170 結合時不顯示防止交換之保護作用的肽，可將抗原決定基範圍縮小至區域 D38-F48。在 mAb 0170 存在或不存在下，區域 R84-L96 顯示很小直至無交換，且不可能斷定此區域是否為 mAb 0170 結合抗原決定基之一部分。肽 K47-A68 在 mAb 0170 結合時顯示免於交換的保護作用，但當 mAb 0170 結合時，肽 T44-C69 被保護。肽之開頭兩個殘基快速回復交換且失去彼等殘基的交換資訊。結論為殘基 E46、K47 及 F48 中之至少一者對於 mAb 0170 結合具有重要作用。

【0234】 表 3：針對人類 TREM-1 之 mAb 0170 之 HXMS 抗原決定基定位結果

肽	mAb 0170
A21-L37	N
A21-D38	N
A21-V39	N
A21-C69	EX
T22-D38	N
D38-Q56	EX
D38-M63	EX
D38-L67	EX
D38-A68	EX
D38-C69	EX
V39-A68	EX

V39-C69	EX
D42-C69	EX
T44-C69	EX
K47-A68	N
A49-C69	N
I57-A68	N
I57-C69	N
I57-L87	N
L67-L87	N
A68-E88	N
A68-L96	N
C69-L87	N
C69-L96	N
T70-L87	N
T70-E88	N
T70-L96	N
R84-L96	LE
E88-L96	LE
Q104-L110	N
Y111-M124	N
Y111-F126	N
Y111-D127	N
C113-F126	N
V114-F126	N
V114-D127	N
I115-F126	N
I115-D127	N

EX：抗體結合時顯示氫交換保護作用的抗原決定基區域。(交換差異(EX)>0.8 氘核)
W：因結構效應引起的弱交換(0.1<EX<0.8)。
N：抗體結合時無防止交換的保護作用。(EX<0.1)
LE：低固有交換

【0235】 針對 *cTREM-1* 之 *mAb 0170* 抗原決定基

【0236】 肽及其交換模式之清單示於表 4 中。

【0237】 當 *mAb 0170* 結合至 *cTREM-1* 時，在涵蓋 E38 至 A68 序列之肽中觀測到防止交換的保護作用且因此確定抗原決定基位於此區域內。考慮到在 *mAb 0170* 結合時不顯示防止交換之保護作用的肽，可將抗原決定基範圍縮小至區域 E38-L45。此抗原決定基與 *hTREM-1* 上之 *mAb 0170* 抗原決

定基很好對應，但截斷三個殘基。hTREM-1 中之肽 C44-T69 在 mAb 0170 結合時受到保護，但 cTREM-1 中涵蓋相應序列之肽 A44-L67 及 A44-A68 不受保護。因此，儘管 hTREM-1 中之殘基 E46、K47 及 F48 中的至少一者促成了結合抗原決定基，但相應殘基 E46、K47 及 Y48 不涉及 mAb 0170 結合至 cTREM-1。

【0238】 表 4：針對食蟹獼猴 TREM-1 之 mAb 0170 的 HXMS 抗原決定基定位

肽	mAb 0170
T21-L37	W
L24-L37	W
T25-L37	W
T25-E38	W
E38-L67	EX
E38-A68	EX
V39-L67	EX
V39-A68	EX
K40-L67	EX
A44-L67	W
A44-A68	W
E46-L67	N
K47-L67	N
A68-L87	W
A68-L96	W
A68-Q97	W
K69-L87	W
K69-L96	W
V82-L96	W
E88-L96	LE
E88-Q97	LE
Q97-L103	N
Q104-L110	N
Y111-C130	W
Y111-L131	W
V114-L131	W
I115-C130	W
I115-L131	W
L131-T180	W
L131-V182	W
V132-T180	W

V132-V182	W
Y152-T180	W
V181-E189	N
V181-H206	W
I190-H206	N
T193-H206	N
V195-H206	N
T196-H206	N
D197-H206	N
EX：抗體結合時顯示氫交換保護作用的抗原決定基區域。(交換差異 (EX) > 0.8 氬核)	
W：因結構效應引起的弱交換 (0.1 < EX < 0.8)。	
N：抗體結合時無防止交換的保護作用。(EX < 0.1)	
LE：低固有交換	

【0239】 實施例 9：藉由表面電漿子共振 (SPR) 研究抗 TREM-1 抗體與人類及食蟹獼猴 TREM-1 的相互作用動力學

【0240】 在經由表面電漿子共振即時量測分子相互作用的 ProteOn 分析儀 (BioRad) 上進行結合研究。在 25°C 進行實驗且樣品在 15°C 樣品隔室中儲存。藉由 ProteOn 報導的信號 (RU, 反應單位) 與六個平行流動池中之個別感測晶片表面上的質量直接相關。根據製造商說明書，將 Biacore 人類或小鼠 Fc 捕捉套組中的抗人類 Fc 單株抗體或抗鼠科 Fc 多株抗體沿水平方向固著於 GLM 感測晶片之流動池上。捕捉抗體之最後固著含量在不同實驗中為約 2600-6000 RU。捕捉純化單株小鼠抗 hTREM-1 抗體或重組表現之抗 hTREM-1 抗體如下進行：抗體於操作緩衝液 (10 mM Hepes、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、0.05% 界面活性劑 P20, pH 7.4) 中稀釋至 5-10 nM, 且以 30 μ l/min 沿垂直方向注射 60 秒，靠近所有流動池形成參考區間斑點，其中僅抗 Fc 抗體被固著。此典型地使測試抗體之最終捕捉量為約 100-300 RU 且使分析物之 Rmax 值為 30-90 RU。hTREM-1 或 cTREM-1 蛋白之結合如下進行：將分析物 (抗原) 沿水平方向注射於所有流動池上，以便相對於結合至參考區間斑點比較性分析與所捕捉之不同抗 TREM-1 抗體的結合。hTREM-1 或

cTREM-1 蛋白於操作緩衝液中 1:3 連續稀釋至 1.2-100 nM，以 100 μ l/min 注射 250 秒且允許解離 600 秒。在分析物每輪注射(經由兩次 18 秒以 100 μ l/min 注射 10 mM 甘胺酸 pH 1.7 及 50 mM NaOH) 之後，使 GLM 表面再生。此再生步驟將抗 TREM-1 抗體及所結合的任何 TREM-1 蛋白自所固著的捕捉抗體表面移除，且使得下一個相互作用樣品對隨後結合。再生程序不能將直接固著的抗 Fc 捕捉抗體自晶片表面移除。

【0241】 抗體與抗原之間的結合親和力係藉由測定平衡解離常數 (K_D) 來定量，平衡解離常數係藉由量測複合物形成及解離之動力學來測定。使用用於資料分析的 ProteOn 評估軟體，藉由將資料與 1:1 朗繆爾模型 (Langmuir model) 擬合來檢索對應於單價複合物之締合及解離的速率常數，諸如 k_a (締合速率) 及 k_d (解離速率)。 K_D 經由方程式 $K_D=k_d/k_a$ 而與 k_a 及 k_d 關聯。

【0242】 在資料分析之前，藉由雙重參照 (減去參考表面信號以及將空白緩衝液注射於所捕捉的抗 TREM-1 抗體上) 來處理結合曲線。由此校正樣品注射期間的儀器雜訊、主體移動及漂移。

mAb	純系	來源	k_a (1/(Ms))	k_d (1/s)	K_D (M)
mAb 0023	5F8A1	融合瘤	1.0E+05	2.2E-04	2.1E-09
mAb 0024	5F28A1	融合瘤	7.8E+04	3.6E-04	4.6E-09
mAb 0025	5F19A1	融合瘤	8.8E+05	8.5E-04	9.7E-10
mAb 0026	5F27A1	融合瘤	6.2E+04	9.7E-05	1.5E-09
mAb 0030	5F17A1B2	融合瘤	1.2E+05	4.2E-04	3.6E-09
mAb 0031	13F6A1	融合瘤	1.2E+06	3.7E-03	3.1E-09
mAb 0032	13F10A1	融合瘤	1.1E+06	2.1E-03	1.9E-09
mAb 0033	9F11A1	融合瘤	7.8E+04	1.1E-03	1.5E-08
mAb 0034	14F17A1	融合瘤	1.9E+05	1.9E-04	1.0E-09
mAb 0039	mIgG2aa 上之 5F8A1	重組體	8.9E+04	1.6E-04	1.8E-09
mAb 0040	mIgG1 上之 5F8A1	重組體	9.3E+04	2.0E-04	2.2E-09
mAb 0041	mIgG2aa 上之 5F27	重組體	7.9E+04	1.8E-04	2.3E-09
mAb 0042	mIgG1 上之 5F27A1	重組體	8.5E+04	2.5E-04	2.9E-09
mAb 0044	14F69A1	融合瘤	1.5E+06	2.9E-04	2.0E-10
mAb 0045	13F14A1	融合瘤	1.3E+06	3.2E-03	2.5E-09

mAb 0046	14F70A1	融合瘤	9.3E+05	1.9E-04	2.1E-10
mAb 0048	14F11A1B1	融合瘤	1.7E+06	3.9E-03	2.4E-09
mAb 0049	14F86A1	融合瘤	8.8E+05	1.3E-03	1.5E-09
mAb 0051	5F24 HC645/LC647	重組體	6.8E+05	3.0E-03	4.5E-09
mAb 0054	14F128A1	融合瘤	1.6E+06	3.8E-03	2.4E-09
mAb 0059	14F113/14F69	重組體	1.7E+06	5.2E-04	3.2E-10
mAb 0063	14F116A1B1	融合瘤	1.0E+06	1.4E-03	1.4E-09
mAb 0064	14F20A1B1	融合瘤	8.9E+05	1.3E-03	1.5E-09
mAb 0067	14F11A1B1	重組體	2.2E+06	3.9E-03	2.0E-09
mAb 0068	14F128/14F11	重組體	2.7E+06	3.9E-03	1.7E-09
mAb 0070	14F113/14F69	重組體	2.1E+06	4.3E-04	2.5E-10
mAb 0078	14F106A2	融合瘤	9.8E+05	1.4E-03	1.5E-09
mAb 0079	14F29A1B1	融合瘤	2.6E+05	1.2E-03	4.6E-09
mAb 0080	14F17A1B1	融合瘤	2.7E+05	1.9E-04	7.1E-10
mAb 0083	14F116A1B1	重組體	1.0E+06	1.7E-03	1.7E-09
mAb 0090	14F113，完全人類化	重組體	2.1E+06	1.5E-03	7.7E-10
mAb 0115	14F113HC/14F128LC，混合且人類化	重組體	1.8E+06	2.4E-02	1.6E-08
mAb 0120	14F113/14F69 hz 變異體 HC A78L	重組體	2.2E+06	1.5E-03	6.7E-10
mAb 0121	14F113/14F69 hz 變異體 HC T93V	重組體	2.8E+06	1.7E-03	6.3E-10
mAb 0122	14F113/14F69 hz 變異體 LC M4L	重組體	2.5E+06	1.4E-03	6.0E-10
mAb 0124	14F113/14F69 hz 變異體 LC G68R	重組體	2.0E+06	1.2E-03	6.1E-10
mAb 0170	14F113/14F69 hz 變異體 LC Q98I	重組體	2.9E+06	5.4E-04	1.9E-10

【0243】 表 5：針對人類 TREM-1 與不同抗 TREM-1 單株抗體之相互作用量測結合常數 k_a （締合速率）、 k_d （解離速率）及 K_D （平衡解離常數）的結果

mAb	純系	來源	k_a (1/(Ms))	k_d (1/s)	K_D (M)
mAb 0048	14F11A1B1	融合瘤	1.4E+05	1.7E-04	1.2E-09
mAb 0059	14F113A1B1C1	重組體	1.8E+05	1.2E-04	6.7E-10
mAb 0067	14F11A1B1	重組體	3.8E+05	1.7E-03	4.7E-09
mAb 0068	14F128/14F11	重組體	2.8E+05	3.4E-03	1.2E-08
mAb 0083	14F116A1B1	重組體	無結合	無結合	無結合
mAb 0090	14F113，完全人類化	重組體	1.4E+05	3.0E-04	2.1E-09
mAb 0121	14F113 hz 變異體 HC T93V	重組體	1.3E+05	1.3E-04	9.4E-10
mAb 0122	14F113 hz 變異體 LC	重組體	1.7E+05	1.6E-04	9.7E-10

	M4L				
mAb 0124	14F113 hz 變異體 LC G68R	重組體	1.7E+05	2.0E-04	1.1E-09
mAb 0170	14F113 hz 變異體 LC Q98I	重組體	2.5E+05	8.9E-04	3.6E-09

【0244】 表 6：針對食蟹獼猴 TREM-1 與不同抗 TREM-1 單株抗體之相互作用量測結合常數 k_a （締合速率）、 k_d （解離速率）及 K_D （平衡解離常數）的結果

【0245】 實施例 10：阻斷性 TREM-1 mAb 14F69 之人類化

【0246】 經由選殖融合瘤 14F128A1 及 14F113A1B1C1 獲得兩種主要抗體之可變區。兩種抗體均使用 SMARTER-RACE 技術（Clontech）選殖。人類化嘗試係使用融合瘤純化抗體作為基準、以迭代循環的形式進行，其中首先評估 CDR 移植抗體的親和力且接著再工程改造以包括更多回復突變直至保留可接受的親和力。CDR 移植抗體用計算機（*in silico*）設計且自供應商（www.genscript.com）定購。隨後使用定點突變誘發（Stratagene）對抗體進行再次工程改造。所有抗體表現於 HEK293-6E 細胞中為親和力測試作準備。下文描述選擇適當人類生殖系及測試回復突變之主要考慮因素。此實施例中所用可變區之所有編號係指 Kabat 編號方案。

- >m14F128A1_H（CDR 以粗體及下劃線標出）（SEQ ID NO 8）
- >m14F128A1_L（CDR 以粗體標出）（SEQ ID NO 9）
- >m14F113A1B1C1_H（CDR 以粗體標出）（SEQ ID NO 10）
- >m14F113A1B1C1_L（CDR 以粗體標出）（SEQ ID NO 11）

【0247】 依據序列分析，根據 Kabats 定義之 m14F128A1 之 CDR 為：

```
>CDR_H1
TYAMH
>CDR_H2
RIRTKS[N/S]NYATYY[V/A]DSVKD
>CDR_H3
DMG[I/A]RRQFAY
>CDR_L1
RASESVD[S/T]F[G/D][I/Y]SF[M/L]H
>CDR_L2
RASNLES
>CDR_L3
QQSNEDPYT
```

m14F128A1 與 m14F113A1B1C1 之間的差異指定為 [m14F128A1/m14F113A1B1C1]。

【0248】 在 MOE [可購自 www.chemcomp.com]中使用標準技術建立 m14F128A1 之 3D 模型且有效 CDR 區 (VH: 31-35B、50-58、95-102; VL: 24-34、50-56、89-97) 之 4.5 Å 內之所有殘基定義為掩蔽殘基。掩蔽殘基對於維持 CDR 中之結合皆具有潛在重要作用。

【0249】 對於重鏈而言，掩蔽殘基包括位置 1-2、4、27-37、47、49-59、69、71、73、78、92-103，且對於輕鏈而言，掩蔽殘基包括位置 1-5、7、23-36、46、48-56、58、62、67-71、88-98。

【0250】 對 m14F128A1 使用生殖系搜尋及人工檢驗，鑑別 VH3_73 及 JH4 為重鏈之適當人類生殖系組合且鑑別 VKIV_B3 及 JK2 為輕鏈之適當人類生殖系組合。

```
>VH3_13/JH4
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYATAYA
ASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR/YFDYWGQGTLLVTVSS
>VKIV_B3/JK2
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP/YTFGQGTKLEIKR
```

【0251】 接著根據以下規則進行人類化：

- 視掩蔽殘基外的殘基為人類殘基。

- 視掩蔽殘基內及 Kabat CDR 內的殘基為鼠科殘基。
- 視掩蔽殘基內及 Kabat CDR 外的具有小鼠/生殖系共同序列的殘基為共同序列。
- 對掩蔽殘基內及 Kabat CDR 外的具有小鼠/生殖系差異的殘基進行潛在回復突變。

將 m14F128A1 之有效 CDR 區移植入生殖系中形成 m14F128A1、hz14F128A1 之基本人類化構築體。

```
>hz14F128A1_H
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRTKSNNYATYYA
ASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRQFAYWGQGLTVTVSS
>hz14F128A1_L
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSFGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGVPD
RFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGQGTKLEIK

>CDR_H1
TYAMH
>CDR_H2
RIRTKSNNYATYYAASVKG
>CDR_H3
DMGIRRQFAY
>CDR_L1
RASESVDSFGISFMH
>CDR_L2
RASNLES
>CDR_L3
QQSNEDPYT
```

【0252】 與鼠科 CDR 的唯一差異在於 CDR_H2（以粗體顯示）。m14F128A1 與 hz14F128A1 之間在掩蔽殘基方面的任何不一致將形成潛在回復突變且清單包括：

hz14F128A1_H: S30N, G49A, A78L, V93T

hz14F128A1_L: M4L, M58I, G68R。

【0253】 此外，利用 m14F128A1 與 m14F113A1B1C1 之親密同源性提出可影響 hz14F128A1 之親和力的殘基。

hz14F128A1_H: N53S, I98Q

hz14F128A1_L: S27D_T, G29D, I30Y, M33L。

【0254】 爲了研究所有潛在人類化 mAb，產生且測試上述突變體之所有組合。

【0255】 來源於融合瘤 14F113 的最後人類化抗 hTREM1 抗體 (mAb 0170) 含有 1 個 LC 構架回復突變 (M4L) 及 1 個 HC CDR3 突變 (Q98I)。根據親和力增效研究，在 HC CDR3 中引入突變，其中高同源性抗體命名爲 14F128。用於包括兩個突變的基本原理描述如下。

【0256】 對抗體 14F128 及 14F113 之親和力增效研究

【0257】 融合瘤抗體 14F128 與 14F113 高度同源且來源於相同體細胞再組合事件。兩種抗體競爭結合 hTREM1，其中 14F113 具有最高親和力。總體而言，兩種抗體之 CDR 移植形式在其 CDR 組成上僅有 6 個胺基酸不同 (4 個位於 LC CDR 中且 2 個位於 HC CDR 中)。6 個突變 (當比較 14F113 與 14F128 時) 爲 LC T27_S、D29G、Y30I、L33M 及 HC S54N、Q98I。儘管 CDR 移植之 14F128 的親和力小於 CDR 移植之 14F113，但研究出當所有 6 個突變皆存在時的總體作用可抑制 6 個突變中之一或多種所產生的有益親和力作用。因此將所有 6 個突變 (除 HC S54N 外) 個別地引入 CDR 移植之 14F113 抗體中且依據親和力對抗體評級。兩個突變 (LC L33M 及 HC Q98I) 個別地能夠改良 CDR 移植之 14F113 的親和力。HC 在位置 Q98I 之突變使所得抗體 (mAb 0170) 產生極佳親和力。

【0258】 構架回復突變親和力分析

【0259】 小鼠型式 14F113 抗體具有 7 個在人類化期間潛在需要包括在內的突變作爲回復突變。HC 及 LC 中之潛在回復突變分別爲 S30N、

G49A、A78L 及 T93V M4L、V58I、G68R。將 7 個回復突變個別地引入 CDR 移植之 14F113 中且接著依據親和力評級。儘管若干突變能夠改良親和力，但對 mAb 0170 僅選擇 LC 突變 M4L。對包括突變的決定相對於表現效價 (HEK293 6E)、親和力及突變總數作出平衡。

【0260】 實施例 11：藉由表面電漿子共振 (SPR) 研究 TREM-1 抗體對 hTREM-1 的相互作用動力學：在 mAb 0170 與市購 TREM-1 抗體之間作出比較

【0261】 在經由表面電漿子共振即時量測分子相互作用的 ProteOn 分析儀 (BioRad) 上進行結合研究。在 25°C 進行實驗且樣品在 15°C 樣品隔室中儲存。藉由 ProteOn 報導的信號 (RU, 反應單位) 與六個平行流動池中之個別感測晶片表面上的質量直接相關。所包括的市購抗體為 Biolegend #314907、Biolegend #316102 (Biolegend, USA)、Hycult Biotech HM2252 (Hycult Biotech, Netherlands)、R&D #MAB1278 (R&D systems, United Kingdom)、SC98Z12 (Santa Cruz Biotechnology, USA)、Sigma #WH0054210m4、Sigma #SAB1405121 (Sigma-Aldrich Danmark A/S)。

【0262】 根據製造商說明書，將 Biacore 人類或小鼠 Fc 捕捉套組中的抗人類 Fc 單株抗體或抗鼠科 Fc 多株抗體沿水平方向固著於 GLM 感測晶片之流動池上。捕捉抗體之最後固著含量在不同實驗中為約 2600-6000 RU。捕捉純化單株小鼠抗 hTREM-1 抗體或重組表現之抗 hTREM-1 抗體如下進行：抗體於操作緩衝液 (10 mM Hepes、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、0.05% 界面活性劑 P20, pH 7.4) 中稀釋至 5-10 nM，且以 30 μ l/min 沿垂直方向注射 60 秒，靠近所有流動池形成參考區間斑點，其中僅抗 Fc 抗體被固著。此典型地使測試抗體之最終捕捉量為約 100-300 RU 且使分析物之 R_{max} 值為 30-90 RU。hTREM-1 或 cTREM-1 蛋白之結合如下進行：將分析物沿水平方向注射於所有流動池上，以便相對於結合至參考區間斑點比較性分析與所捕捉之

不同抗 TREM-1 抗體的結合。hTREM-1 或 cTREM-1 蛋白於操作緩衝液中 1:3 連續稀釋至 1.2-100 nM，以 100 μ l/min 注射 210 秒且允許解離 600 秒。在分析物每輪注射（經由兩次以 100 μ l/min 注射 10 mM 甘胺酸 pH 1.7 及 50 mM NaOH）之後，使 GLM 表面再生。此再生步驟將抗 TREM-1 抗體及所結合的任何 TREM-1 蛋白自所固著的捕捉抗體表面移除，且使得下一個相互作用樣品對隨後結合。再生程序不能將直接固著的抗 Fc 捕捉抗體自晶片表面移除。

【0263】 抗體與抗原之間的結合親和力係藉由測定平衡解離常數 (K_D) 來定量，平衡解離常數係藉由量測複合物形成及解離之動力學來測定。使用用於資料分析的 ProteOn 評估軟體 3.1.0.6，藉由將資料與 1:1 朗繆爾模型擬合來檢索對應於單價複合物之締合及解離的速率常數，諸如 k_a （締合速率）及 k_d （解離速率）。 K_D 經由方程式 $K_D=k_d/k_a$ 而與 k_a 及 k_d 關聯。

【0264】 在資料分析之前，藉由雙重參照（減去參考表面信號以及將空白緩衝液注射於所捕捉的抗 TREM-1 抗體上）來處理結合曲線。由此校正樣品注射期間的儀器雜訊、主體移動及漂移。

【0265】 表 7：針對人類及食蟹獼猴 TREM-1 與不同抗 TREM-1 單株抗體之相互作用量測 K_D （平衡解離常數）的結果

抗體	人類 TREM-1 KD (M)	食蟹獼猴 TREM-1 KD (M)
mAb 0170	2E-10	3E-09
Biologend #314907	9E-10	4E-09
Biologend #316102	8E-10	無結合
Hycult Biotech HM2252	3E-09	無結合
R&D #MAB1278	8E-09	無結合
SC98Z12	3E-08	無結合
Sigma #WH0054210m4	2E-08	無結合
Sigma #SAB1405121	無結合	無結合

【0266】 實施例 12：藉由表面電漿子共振對抗人類 TREM-1 單株抗

體進行競爭結合研究

【0267】 爲了區別不同結合位點（抗原決定基），使用單株小鼠抗 hTREM-1 抗體或重組表現之人類化抗 hTREM-1 抗體進行 SPR 競爭結合研究。所包括的市購抗體 Biolegend #314907 (Biolegend, USA) 及 SC98Z12 (Santa Cruz Biotechnology, USA)。競爭抗原上之相同或重疊結合位點（抗原決定基）的抗 hTREM-1 單株抗體不能同時結合至抗原且因此歸爲同「組」。不競爭抗原上之相同或重疊結合位點的抗 TREM-1 單株抗體能夠同時結合且因此歸爲不同「組」。使用人類可溶性 TREM-1 胞外域作爲抗原來進行實驗。

【0268】 所有研究均在 25°C 進行，且樣品在 15°C 樣品隔室中儲存。使用 0.4 M EDAC [1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽]與 0.1 M 磺基-NHS [N-羥基磺基丁二醯亞胺]之 1:1 混合物將個別抗 TREM-1 單株抗體及無關的對照單株抗體固著於 GLC 感測晶片之各別流動池上。各抗體於 10 mM 乙酸鈉 pH 5.0 中稀釋至濃度爲 25 $\mu\text{g/ml}$ 或 10 $\mu\text{g/ml}$ (SC98Z12 (80394))，且以 30 $\mu\text{l/min}$ 固著至個別流動池 240 秒。抗體固著至流動池 L1-L6 (包括對照)。抗體固著之後，流動池上之活性位點用 1 M 乙醇胺阻斷。在水平方向上利用活化及去活化作用進行固著，從而形成無蛋白質固著之區間斑點參考點。在一個實驗中，測試抗體之最終固著量的範圍爲約 1100 RU 至 1300 RU，除一種抗體 (SC98Z12) 外 (其中固著量僅 390 RU)。重組人類 TREM-1 於操作緩衝液 (10 mM Hepes、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、0.05% 界面活性劑 P20，pH 7.4) 中稀釋至 100 nM。抗原以 30 $\mu\text{l/min}$ 沿水平方向注射於所固著之抗體上 300 秒，從而控制對區間斑點參考物及所固著之對照抗體的潛在無特異性結合，使得 TREM-1 捕捉量爲 150-600 RU，固著量低的一種抗體 (SC98Z12) 除外 (其中捕捉量僅 4 RU)。

【0269】 各抗體 (已固著者) 沿水平方向注射於平行流動池上，以便相對於結合至區間斑點參考物及所固著之對照抗體比較性分析與初級抗體

所捕捉之 hTREM-1 的結合。各競爭性抗體稀釋至 100 nM 且以 100 μ l/min 注射 250 秒。在分析物每輪注射（經由兩次 18 秒以 100 μ l/min 注射 1 M 甲酸 pH 3.5、3 M MgCl₂ 及 50 mM NaOH）之後，使 GLC 晶片再生。此再生步驟自所固著之抗體表面移除 TREM-1 抗原及所結合之任何二級抗體，且允許下一個測試樣品之隨後結合。再生程序不能將直接固著之抗 TREM-1 測試抗體（初級抗體）自晶片表面移除。使用 ProteOn Manager™ 3.1.0.6 軟體進行資料分析。評估捕捉量以確保再生步驟在依序注射期間提供一致的結合表面。觀測到人類 TREM-1 未顯著地非特異性結合至區間斑點對照表面，亦未顯著地結合至所固著之對照抗體。藉由減去區間斑點對照表面信號來處理結合曲線。由此校正樣品注射期間的儀器雜訊及主體轉移。

【0270】 競爭結果係以陽性或陰性結合報導（表 8）。陽性（+）結合表示競爭性抗體能夠與初級抗體同時結合 hTREM-1（亦即其不競爭），且初級抗體及競爭性抗體因此歸為不同抗原決定基組。陰性結合表示競爭性抗體不能與初級抗體同時結合 hTREM-1（亦即其競爭），且初級抗體及競爭性抗體因此歸為相同抗原決定基組。此等實驗中之反應值顯著且從而可明確地確定抗 TREM-1 單株抗體之抗原決定基組。

【0271】 表 8：在 SPR 競爭檢定中能夠結合（+）或能夠競爭（-）所測試之抗體。SC98Z12 對 TREM-1 未給予足夠高的捕捉，評估為初級抗體（*）。

二級抗體	初級抗體			
	Biolegend #314907	SC98Z12	mAb 0048	mAb 0170
Biolegend #314907	-	*	+	+
SC98Z12	-	*	+	+
mAb 0048	+	*	-	-
mAb 0170	+	*	-	-

【0272】 MAb 0170 及 mAb 0048（由融合瘤 14F11 純化而得，其與

14F128 相同) 顯示可競爭性結合至人類 TREM-1。Biolegend #314907 與 SC98Z12 對於結合人類 TREM-1 不與此等中之任一者競爭，但彼此之間競爭。此等發現得出結論：前兩者 (mAb 0048 及 mAb 0170) 屬於同組 (組 1)，而 Biolegend #314907 及 SC98Z12 屬於另一組 (組 2)。

【0273】 實施例 13：對結合至人類及食蟹獼猴 TREM-1 之突變型式之 Fab 0011 與 Fab 0170 之間相互作用的動力學分析

【0274】 藉由 SPR 進行相互作用研究，以定義針對人類 TREM-1 之 0011 與 0170 抗人類 TREM-1 抗體之抗原決定基的差異。藉由比較已知抗原決定基中引入丙胺酸突變之人類 TREM-1 變異體與食蟹獼猴 TREM-1 之部分「人類化」變異體 (後者係因為僅 mAb 0170 與食蟹獼猴 TREM-1 交叉反應) 的結合動力學，鑑別對於各別抗原決定基而言為獨特的胺基酸殘基。

【0275】 此研究中所用的 hTREM-1 胞外域丙胺酸突變體構築體及部分人類化食蟹獼猴突變體構築體概述於表 9 中。所用全部構築體為 SEQ ID NO: 19 (食蟹獼猴 TREM-1 變異體) 或 SEQ ID NO: 20 (人類 TREM-1 變異體) 之任一變異體且在 SPR 結合動力學檢定中包括用於捕捉的 C 端 -cmyc²-His⁶ 標籤。除非另有說明，否則此實施例中提及的序列係根據圖 11 編號。

【0276】 表 9

TREM-1 變異體	蛋白質	突變
0221	人類 TREM-1 Ala 突變體 1	D38A
0222	人類 TREM-1 Ala 突變體 2	K40A
0223	人類 TREM-1 Ala 突變體 3	D42A
0224	人類 TREM-1 Ala 突變體 4	T44A
0225	人類 TREM-1 Ala 突變體 5	E46A
0226	人類 TREM-1 Ala 突變體 6	K47A
0227	人類 TREM-1 Ala 突變體 7	S50A
0228	人類 TREM-1 Ala 突變體 8	R84A
0229	人類 TREM-1 Ala 突變體 9	Y90A
0230	人類 TREM-1 Ala 突變體 10	H91A
0231	人類 TREM-1 Ala 突變體 11	D92A

0232	人類 TREM-1 Ala 突變體 12	H93A
0233	人類 TREM-1 Ala 突變體 13	R97A
0234	人類 TREM-1 Ala 突變體 14	R99A
0235	人類 TREM-1 Ala 突變體 15	D127A
0236	人類 TREM-1 Ala 突變體 16	R128A
0237	人類 TREM-1 Ala 突變體 17	R130A
0238	食蟹獼猴 TREM-1 野生型	-
0239	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化」	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91H
0240	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 1」	A44A, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91H
0241	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 2」	A44T, Y48Y, N50S, R52Q, E75K, P91H
0242	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 3」	A44T, Y48F, N50N, R52Q, E75K, P91H
0243	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 4」	A44T, Y48F, N50S, R52R, E75K, P91H
0244 (SEQ ID NO: 14)	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 5」	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75E, P91H
0245 (SEQ ID NO: 15)	食蟹獼猴 TREM-1,「部分人類化而具有回復突變 6」	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91P
0247	人類 TREM-1 野生型	-

【0277】 在經由表面電漿子共振即時量測分子相互作用的 ProteOn 分析儀上進行結合研究。在 25℃ 進行實驗且樣品在 15℃ 樣品隔室中儲存。藉由 ProteOn 報導的信號 (RU, 反應單位) 與六個平行流動池中之個別感測晶片表面上的質量直接相關。使用 0.4 M EDAC [1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽]與 0.1 M 磺基-NHS [N-羥基磺基丁二醯亞胺]之 1:1 混合物將抗 His 單株抗體固著於 GLM 感測晶片之 6 個平行流動池上。抗體於 10 mM 乙酸鈉 pH 5.0 中稀釋至濃度為 25 μ g/ml, 且以 30 μ l/min 在個別流動池上固著 240 秒。抗體固著之後, 流動池上之活性位點用 1 M 乙醇胺阻斷。使用所有步驟沿水平方向進行固著。在一個實驗中, 捕捉抗體之最終固著量為約 8000 RU。表現人類或食蟹獼猴 TREM-1 ECD 之野生型或不同突變變異體之 HEK 293 細胞的細胞培養基在操作緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05%界面活性劑 P20, pH 7.4) 中稀釋 40-60 倍。將 TREM-1 蛋白沿垂直方向以 30 μ l/min 注射於所固著之抗 His 捕捉抗體 60 秒。由此使得 TREM-1 捕捉量為 50-250 RU 且形成區間斑點參考物, 其中在水平方向

上僅固著有捕捉抗體，而無捕捉之 TREM-1。各 Fab 沿水平方向注射於平行流動池上以便對與抗 His 抗體所捕捉之 TREM-1 變異體的結合進行動力學分析。注射之前，各 Fab 於操作緩衝液中稀釋至 0 nM、5.5 nM（在一個實驗中）、16.7 nM 及 50 nM，且以 100 μ l/min 注射 250 秒（締合時間）。對此等注射之後的解離時間監測 10 分鐘。經由兩次 18 秒以 100 μ l/min 注射 10 mM 甘胺酸及 50 mM NaOH，在 TREM-1 與 Fab 每輪相互作用之後，使 GLM 晶片再生。此再生步驟將 TREM-1 變異體及所結合之任何 Fab 自抗 His 抗體表面移除，且允許下一個相互作用對之隨後結合。再生程序不能將直接固著的抗 His 捕捉抗體自晶片表面移除。

【0278】 爲了獲得動力學資料，諸如 k_a （締合速率）、 k_d （解離速率）及 K_D （平衡解離常數），使用 ProteOn Manager™ 3.1.0.6 軟體進行資料分析。對一式兩份或一式三份操作之樣品的捕捉及結合量進行評估，以確保再生步驟在依序注射期間提供一致的結合表面。對於僅固著有捕捉抗體的區間斑點參考物未觀測到顯著的無特異性結合。藉由減去區間斑點對照表面信號以及注射操作緩衝液來處理結合曲線。由此校正樣品注射期間的儀器雜訊及主體轉移。

【0279】 將 0170 Fab 及 0011 Fab 對不同 TREM-1 ECD 變異體的親和力與對野生型人類或食蟹獼猴 TREM-1 ECD 之親和力進行比較。

【0280】 亦評估在 Fab 注射結束之後 10 秒時的結合量（相對於所捕捉之 TREM-1 變異體之量歸一化），以便鑑別結合消除或極低的突變型式。親和力下降與歸一化結合量顯著降低之組合可表示因引入突變所引起的摺疊中斷。然而應注意動力學變化亦將影響此值。因此目測檢查各結合曲線以便得出結論（資料未示）。

【0281】 具有丙胺酸單一突變之人類 TREM-1 的結果（表 10）顯示，兩個位置（E46 及 D92）獨特之處在於其使針對 0170 Fab 的結合降低超過兩倍。

【0282】 表 10：0170 Fab 及 0011 Fab 對人類 TREM-1 的親和力，相對於人類 TREM-1 野生型，該人類 TREM-1 具有丙胺酸突變。締合結束之後 10 秒時的 0170 Fab 及 0011 Fab 結合量（以理論最大結合度表示）。

構築體	突變	K_D ，相對於 0247	歸一化結合（理論 R_{max} %）
-----	----	-----------------	-----------------------

		0170 Fab	0011 Fab	0170 Fab	0011 Fab
0247	-	1	1	44	41
0221	D38A	0.7	15.0	29	5
0222	K40A	0.9	無結合	43	1
0223	D42A	132.9	26.9	13	3
0224	T44A	1.2	1.8	46	40
0225	E46A	2.7	0.9	44	44
0226	K47A	1.0	1.1	40	38
0227	S50A	0.7	0.9	45	41
0228	R84A	0.5	1.3	15	8
0229	Y90A	0.5	2.9	40	31
0230	H91A	0.9	2.5	41	33
0231	D92A	9.2	1.1	34	41
0232	H93A	36.4	5.2	22	29
0233	R97A	1.1	6.2	36	22
0234	R99A	0.8	1.0	15	11
0235	D127A	1.1	0.8	43	41
0236	R128A	0.9	1.2	39	35
0237	R130A	1.0	0.8	35	34

【0283】 與 mAb-0011 相比，mAb-0170 能夠結合食蟹獼猴 TREM-1。食蟹獼猴 TREM-1 在所選區域中之人類化使得 0177 之親和力相較於人類 TREM-1（0247）未恢復，表示其他殘基或殘基組合對針對人類 TREM-1 與食蟹獼猴 TREM-1 之親和力之差異具有重要作用。

【0284】 0243 顯示不結合至 0170 Fab 或 0011 Fab。對於此構築體，不能排除突變已影響總體結構且因此不能斷定 Q52 涉及所研究之 Fab 結合至人類 TREM-1。

【0285】 表 11：0170 Fab 及 0011 Fab 對野生型食蟹獼猴 TREM-1 ECD、部分人類化之食蟹獼猴 TREM-1 ECD 變異體及野生型人類 TREM-1 ECD 的親和力。締合結束之後 10 秒時的 0170 Fab 及 0011 Fab 結合量（以理論最大結合度表示）。

構築體	KD (M)		歸一化結合（理論 Rmax %）	
	0170 Fab	0011 Fab	0170 Fab	0011 Fab
野生型 cTREM-1	1E-09	無結合	39	0
0239	2E-09	>1 μ M	19	1

0240	2E-09	>1 μ M	28	0
0241	2E-09	>1 μ M	26	2
0242	1E-09	>1 μ M	21	1
0243	無結合	無結合	5	1
0244	1E-09	無結合	7	0
0245	1E-09	無結合	34	0
0247	2E-10	1E-09	45	42

【0286】 實施例 14：mAb 0170 在 BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定中有效阻斷 TREM-1 活化

【0287】 使用實施例 6 中所述之 BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定計算 mAb 0170 阻斷 TREM-1 之效力。用 TREM-1 配位體複合物刺激 BWZ/hTREM-1 報導細胞且添加各種濃度的 mAb 0170。圖 9 顯示 TREM-1 信號之劑量依賴性阻斷，在濃度高於 0.2 μ g/ml 時，信號被完全阻斷。使用 Graphpad Prism 軟體（方程式： $\log(\text{抑制劑})$ 相對於反應--可變斜率）測定 IC50 值為 2.4 nM。

【0288】 實施例 15：市購 TREM-1 抗體在 BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定中不能阻斷 TREM-1 活化

【0289】 如先前所述，BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定中包括多種劑量之抗體。SAB1405121（純系 3F5，購自 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA）、WH0054210M4（純系 2E2，購自 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA）、sc-80394（純系 98Z12，購自 Santa Cruz, California, USA）、HM2252（純系 6B1，購自 Hycult biotech, 5405 PB UDEN, The Netherlands）、316102（純系 TREM-37，購自 Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）及 314907（純系 TREM-26，購自 Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）不能顯著阻斷 TREM-1 活性，而本文揭示之 mAb 0170 在 0.3 μ g/ml 下可阻斷 TREM-1 活性超過 99%。即使在 3 μ g/ml 下，同型對照物具有>95%殘餘活性。

【0290】 表 12

抗 TREM-1 純系	殘餘活性%，在 0 μ g/ml 下	殘餘活性%，在 0.003 μ g/ml 下	殘餘活性%，在 0.03 μ g/ml 下	殘餘活性%，在 0.3 μ g/ml 下
-------------	---------------------------	-------------------------------	------------------------------	-----------------------------

SAB1405121	100	104	101	97
WHO054210M4	100	98	104	86
sc-80394	100	120	134	131
HM2252	100	96	122	113
316102 (0.09%疊氮化物)	100	98	103	90
314907	100	100	124	108
mAb 0170	100	96	80	0

【0291】 實施例 16：mAb 0170 阻斷食蟹獼猴 TREM-1

【0292】 爲了測試針對其他物種之 TREM-1 的功能性，將小鼠及食蟹獼猴 TREM-1 連同人類及小鼠 DAP12 一起分別轉染，以產生報導細胞檢定作爲用於人類的檢定。此舉基本上如針對人類系統（實施例 1、2 及 6）所述進行，但用全長鼠科(m)TREM-1（SEQ ID NO: 22）或全長食蟹獼猴(c)TREM-1（SEQ ID NO: 21）置換人類 TREM-1。在 GeneArt 合成編碼 cTREM-1（SEQ ID NO: 22）之 cDNA 且以 XhoI-XbaI 位向選殖於 pHLEF38（由 CMC ICOS 特許）中。使用 BTX 電穿孔儀（260 V，1050 μ F，720 ohm；時間常數爲 23 毫秒），使用 10 μ g 各質體及 8e6 個電穿孔細胞，以約 500 μ l 總體積（400 μ l 生長培養基及 100 μ l DNA）將 TE α NFAT Luc 細胞與 pHLEF38.cynoTrem1 及 pNEF38.NFlag hDAP12 共轉染。細胞於 10 ml 50%改良性培養基中在 10 cm 培養盤中塗鋪 48 小時且於具有 800 μ g/ml G418 及 0.5 mM L-組胺醇之 30%改良性培養基中、以 200 微升/孔、以 8e3 個細胞/孔直接塗鋪於所選擇之 96 孔平底盤（5 個盤）中。2 週培育之後，使用 Genetix 純系選擇影像儀鑑別 40 種單一純系。

【0293】 能夠與食蟹獼猴 TREM-1 交叉反應的唯一市購 TREM-1 抗體爲 314907（純系 TREM-26，購自 Biolegend, San Diego, CA 92121, USA）（參見實施例 11）。實施例 15 中所測試之市購抗體皆不能阻斷食蟹獼猴 TREM-1 之功能，甚至不能阻斷可結合至食蟹獼猴 TREM-1 之食蟹獼猴 TREM-1 之功

能。

【0294】 表 13

食蟹獼猴 TREM-1 殘餘活性% [mAb 量]	mAb 0170	314907
0 μ g/ml	100.00	100.00
0.74 μ g/ml	7.97	103.97
20 μ g/ml	0	87.72

【0295】 同樣，產生具有小鼠 TREM-1 之報導細胞系。能夠結合至人類 TREM-1 或結合至食蟹獼猴及人類 TREM-1 的抗體皆不能交叉結合至小鼠 TREM-1。因此，基本上如針對產生人類 TREM-1 抗體所述產生針對小鼠 TREM-1 的抗體，但使用小鼠 TREM-1 作為抗原。在鼠科報導基因檢定中，針對小鼠 TREM-1 結合及阻斷功能篩選此等抗體。一種此抗體（mAb 0174）能夠結合且阻斷小鼠 TREM-1 功能。

【0296】 實施例 17：TREM-1 抗體阻斷了 PGLYRP-1 刺激的 M2 巨噬細胞釋放 $\text{TNF } \alpha$

【0297】 熟習此項技術者將認識到建立來自多位供者之初級細胞之冷凍庫、從而方便地複製實驗的意義。試管內獲得的巨噬細胞係由外周血液單核細胞如下產生。使用來自 Stem Cell Technologies（Vancouver, BC, Canada）的 Rosette Sep 套組（目錄號 15068），依據製造商說明書，自獲自 Research Blood Components（Brighton, MA, USA）的外周血液「leukopak」分離出負向增濃之單核細胞。所分離的單核細胞以 50e6 個細胞/毫升懸浮於 10% DMSO/FBS 中且逐漸冷卻至 -80°C。為產生巨噬細胞，將一或多個冷凍單核細胞小瓶在 37°C 水浴中快速解凍，用具有 10% FBS（Fisher Scientific，目錄號 03-600-511）的生長培養基（RPMI 1640（Gibco, Carlsbad CA, USA），目錄號 72400-047）稀釋至 10 ml 且以 250 g 離心 5 分鐘。細胞以 2e6 個細胞/毫升懸浮於補充有 50 ng/ml 人類 MCSF（Gibco，目錄號 PHC9501）的生長

培養基中，置於經組織培養液處理的皮氏樣式 (petri style) 組織培養盤中且置於經程式化以維持 5% CO₂、2% O₂ 之「低氧」氛圍的增濕恆溫箱中。培養第三天時，添加等體積之補充有 50 ng/ml 人類 MCSF 之生長培養基供養細胞。培養 6 天之後，單核細胞已分化成 M0 巨噬細胞。如下使 M0 細胞進一步分化：將培養基更換為補充有 50 ng/ml 人類 IFN γ (Gibco, 目錄號 PHC4031) (分化成 M1 巨噬細胞) 或 40 ng/ml 人類 IL-4 (Gibco, 目錄號 PHC0045) (分化成 M2 巨噬細胞) 的生長培養基且返回至恆溫箱中另培育 22 小時。在第七天，巨噬細胞適當分化而可用於生物檢定中。簡言之，藉由用 1X PBS 洗滌、隨後用含有 5 mM EDTA 之 PBS 洗滌而自皮氏盤中回收巨噬細胞。接著使盤恢復至 37°C 維持 30 分鐘且使用 10 ml 注射器及 22G 針將細胞自盤「強力洗去」。細胞接著於生長培養基中稀釋，以 250 g 離心 5 分鐘，隨後將細胞集結粒懸浮直至最終濃度為 1e6/ml。

【0298】 如上製備的巨噬細胞用於生物檢定中，其中藉由 ELISA 量測改良性培養基中回應 TREM-1 配位體刺激細胞所產生的細胞激素，諸如 TNF- α 。此生物檢定進一步用於量測 TREM-1 特異性抗體對此 TREM-1 配位體刺激的阻斷作用。TREM 配位體或陰性對照係以 4 倍濃度製備且於生長培養基中向 96 孔微量滴定盤中每孔添加 50 微升。TREM-1 配位體之最終濃度由 7.5 ng/ml 重組人類 PGLYRP1 (參見實施例 5) 及 3 μ g/ml PGN-BS (Invivogen,tlrl-pgnbs, SanDiego CA, USA) 組成。細胞在如上文所述之增濕低氧條件下培養 22 小時，隨後收集改良性培養基且藉由 ELISA，依據製造商說明書 (R&D Systems,目錄號 DY210, MN, USA) 量測 TNF- α 含量。圖 10 顯示 TREM-1 抗體減少 TNF α 自此等所刺激之 M2 巨噬細胞中的釋放。

【0299】 下表 12 顯示此實驗之 IC₅₀ 值，表示本文揭示之抗體非常有效地阻斷 TREM-1 依賴性細胞激素釋放。

【0300】 表 14

抗體 (mAb)	R 平方	IC50 , ng/ml
0122	0.99	14
0170	0.99	12
0090	0.99	21
0115	0.88	92

【0301】 實施例 18：mAb 0170 可阻斷食蟹獼猴巨噬細胞釋放 $\text{TNF } \alpha$

【0302】 外周血液源巨噬細胞在先天免疫調節及活化之研究中充當極好的試管內模型。TREM-1 已知在控制此過程中起關鍵作用。為瞭解調節 TREM1 信號傳導的活體內作用，關鍵是使用非人類靈長類動物物種長尾獼猴 (*Macaca fascicularis*)，一般稱為食蟹獼猴 (*Cynomolgus monkey*)。在此實施例中，測試抗 TREM-1 抗體在食蟹獼猴 M2 巨噬細胞培養液中阻斷細胞激素之產生的能力。

【0303】 如下產生巨噬細胞。使用肝素鈉真空採血管（目錄號 3664870，Bectin Dickinson Franklin Lakes NJ, USA），藉由靜脈穿刺收集來自健康雄性成年動物（SNBL, Everett WA, USA）的全血。全血用 PBS 稀釋至 30%，接著取 30 ml 小心地鋪層在於 50 ml 錐形管中用 PBS 預稀釋至 96% 的 15 ml Ficoll-Paque（目錄號 17-1440-03，GE Healthcare, Uppsala Sweden）上。在室溫以 400 g 低加速及無制動離心 30 分鐘之後，自 Ficoll/血漿界面收集外周血液單核細胞（PBMC），用 PBS 稀釋 3 次且在室溫以 200 g 離心 7 分鐘。將含有污染性血小板的上清液吸出且丟棄且將細胞集結粒再懸浮於 30 ml 之 PBS + 0.2% FBS（胎牛血清）中。此細胞洗滌過程另外重複 2 輪，隨後將 PBMC 細胞集結粒以 2×10^6 個細胞/毫升再懸浮於 RPMI 培養基（目錄號 61870-036，Life Technologies, Grand Island NY, USA）+ 10% FBS 中且以 20 毫升/盤分配於 15 cm 皮式盤（目錄號 430599 Corning, Tewksbury MA, USA）上。藉由在 37°C、5% CO_2 、100% 濕度下培育隔夜來讓單核細胞黏附至塑膠上，

隨後藉由輕緩渦旋及振動盤 20 秒、隨後抽吸來移除未黏附細胞。向各盤中添加 20 ml 補充有 50 ng/ml hMCSF(目錄號 PHC9501, Life Technologies, Grand Island NY, USA) 的新鮮生長培養基且在 37°C、5% CO₂、2% O₂、100%濕度之低氧培養條件下置放 7 天。培養第三天時，添加等體積之補充有 50 ng/ml 人類 MCSF 之生長培養基供養細胞。培養 6 天之後，單核細胞已分化成 M0 巨噬細胞。如下使 M0 細胞進一步分化：將培養基更換為補充有 50 ng/ml 人類 IFN γ (Gibco, 目錄號 PHC4031) (分化成 M1 巨噬細胞) 或 40 ng/ml 人類 IL-4 (目錄號 PHC0045, Life Technologies, Grand Island NY, USA) (分化成 M2 巨噬細胞) 的生長培養基且返回至恆溫箱中另培育 22 小時。在第七天，巨噬細胞適當分化而可用於生物檢定中。簡言之，藉由用 1X PBS 洗滌、隨後用含有 5 mM EDTA 之 PBS 洗滌而自皮氏盤中回收巨噬細胞。接著使盤恢復至 37°C 維持 30 分鐘且使用 10 ml 注射器及 22G 針將細胞自盤「強力洗去」。細胞接著於生長培養基中稀釋，以 250 g 離心 5 分鐘，隨後將細胞集結粒懸浮直至最終濃度為 1e6/ml。

【0304】 如上製備的巨噬細胞用於生物檢定中，其中藉由 ELISA 量測改良性培養基中回應 TREM-1 配位體刺激細胞所產生的細胞激素，諸如 TNF- α 。此生物檢定進一步用於量測 TREM-1 特異性抗體對此 TREM-1 配位體刺激的阻斷作用。TREM-1 配位體或陰性對照物係以 4 倍濃度製備且於生長培養基中向 96 孔微量滴定盤中每孔添加 50 微升。TREM-1 配位體之最終濃度由 7.5 ng/ml 重組人類 PGLYRP1 (如實施例 5 所述產生) 及 3 μ g/ml PGN-BS (目錄號 tlrl-pgnbs, Invivogen SanDiego CA, USA) 組成。抗體於生長培養基中以 50 微升/孔添加，隨後細胞以每孔 50 微升巨噬細胞添加。細胞在如上文所述之增濕低氧條件下培養 22 小時，隨後收集改良性培養基且藉由 ELISA，依據製造商說明書 (目錄號 DY1070, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) 量測 TNF- α 含量。下表顯示在對照抗體或抗 TREM-1 抗體存在

下經 TREM-1 配位體(PGLYRP1+PGN)刺激之 M2 巨噬細胞培養物之 $\text{TNF } \alpha$ 值。

M2 巨噬細胞：	供者 1 TNF- α , pg/ml		供者 2 TNF- α , pg/ml	
	平均值	標準差	平均值	標準差
僅細胞	0.5		19.0	12.0
僅 PGRP-S	3.5		13.0	6.3
僅 PGN BS	5.7	2.8	22.4	3.8
PGN+PGRP-S	295.3	49.3	307.4	75.8
+Fc4 neg -3	248.5	54.0	285.0	57.6
+Fc4 neg -1	215.6	41.5	295.0	59.0
+Fc4 neg -.33	217.5	49.7	357.7	118.6
+Fc4 neg -.11	193.9	40.4	348.4	75.7
+Fc4 neg -.037	172.6	57.6	370.7	88.6
+Fc4 neg -.012	177.6	38.1	286.7	71.5
+Fc4 neg -.0041	275.4	67.9	253.3	45.0
+0170-3	33.3	8.8	57.2	3.2
+0170-1	41.3	8.5	47.0	10.5
+0170-.33	45.3	14.3	80.4	21.6
+00170-.11	42.2	12.4	103.8	32.8
+0170-.037	54.4	18.5	142.3	43.5
+0170-.012	86.2	24.4	203.8	55.6
+0170-.0041	186.7	21.0	249.3	92.5
+0170-.0014	231.2	56.0	286.1	112.8
+0170-.00046	246.4	22.7	254.2	70.5

【0305】 此實施例說明抗 TREM-1 Ab-0170 可有效阻斷來源於食蟹獼猴之巨噬細胞的 TREM 依賴性細胞激素產生。此 Ab 之功效證明其在食蟹獼猴活體內毒理學及疾病治療模型中的用途。

【0306】 實施例 19：TREM-1 抗體可阻斷所刺激之外周血液單核細胞釋放 $\text{TNF } \alpha$

【0307】 將來自白血球層(buffy coat)且於 RPMI 1640(目錄號 61870, Gibco, New York, USA)、20% FBS (目錄號 16140-071, Gibco, New York, USA)、10% DMSO(目錄號 D2650, Sigma, Steinheim, Germany)中冷凍之 PBMC

解凍且於 RPMI、10% FBS、1%青黴素/鏈黴素（目錄號 15070-06，Gibco, New York, USA）中洗滌兩次，且再懸浮於相同培養基中至 4×10^6 /ml。細胞接著以 400,000 個細胞/孔分佈。向孔中添加 $10 \mu\text{g/ml}$ PGN-SA（目錄號 tlrl-pgnsa，Invivogen, San Diego, USA）及 $0.2 \mu\text{g/ml}$ PGLYRP1 用於刺激細胞。隨後，在 RPMI 中稀釋有關同型及 TREM-1 抗體且分別以 1.34 nM 及 0.167 nM 添加。在 37°C 、5% CO_2 下培育 20 小時之後，藉由 diaplex（目錄號 880.090.001，Genprobe, Besancon, France），根據製造商方案量測 $\text{TNF } \alpha$ 釋放。如下表 13 中所示，本文揭示之 TREM-1 抗體（mAb 0044、0070 及 0059）皆能夠減少 $\text{TNF } \alpha$ 自 PBMC 細胞的釋放。

【0308】 表 15

抑制%（與同型相比）	1.34 nM 下之同型	0 nM	0.167 nM
a-Trem-1 0044 (mIgG2a)	100	100	68
a-Trem-1 0070 (hIgG4)	100	117	76
a-Trem-1 0059 (hzIgG1.1)	100	105	61

【0309】 PBMC 釋放 $\text{TNF } \alpha$ 被抑制約 70%（使用阻斷性 TREM-1 抗體）指示對所刺激之細胞培養物中之細胞激素含量產生顯著影響。

【0310】 實施例 20：抗 TREM-1 mAb 可抑制含氧量正常之巨噬細胞中 PGN+PGLYRP1 誘導之 $\text{TNF } \alpha$ 產生

【0311】 抗 TREM-1 抗體可阻斷巨噬細胞之刺激（使用 PGN-BS + 人類 PGLYRP1 作為 TREM-1 受體之刺激劑）。

【0312】 如實施例 15，單核細胞分化成 M2 巨噬細胞。分化及刺激細胞之所有步驟皆在正常大氣含氧量（氧正常）下、在 37°C 、5% CO_2 恆溫箱中進行。所分化之 M2 巨噬細胞再懸浮於 RPMI/10% FBS 中且以 5×10^5 個細胞/毫升一式三份地（除非另有說明）塗鋪於測試孔中。接著利用以下刺激方案刺激細胞 24 小時：無添加；PGLYRP1、PGN-BS（Invivogen, tlrl-pgnbs）

(兩組，一式三份)、PGN-BS + PGLYRP1 (三組，一式三份)，或 PGN-BS + PGLYRP1 (在抗 TREM-1 或同型對照抗體存在下)。接著收集上清液且使用 BioPlex(Bio-Rad, 171-B5026M)分析 $\text{TNF } \alpha$ 。針對 TREM-1 的抗體(0.1 $\mu\text{g/ml}$) mAb-0122 及 mAb-0170 能夠降低 $\text{TNF- } \alpha$ 釋放。

【0313】 表 16

經以下方案刺激之巨噬細胞	供者 1 TNFa pg/ml		供者 2 TNFa pg/ml	
	平均值	標準差	平均值	標準差
無添加	0	0	0	0
PGLYRP1	0	0	0	0
PGN-BS	427	86	381	85
PGN-BS+PGLYRP1	728	293	771	220
PGN-BS+PGLYRP1 +hIgG4 同型 對照物	987	183	884	41
PGN-BS+PGLYRP1 +mAb 0122	243	14	367	16
PGN-BS+PGLYRP1 +mAb 0170	122	106	224	54

【0314】 此實施例說明抗 TREM-1 mAb-0122 及 mAb-0170 可抑制在含氧量正常條件下所生長之巨噬細胞產生 $\text{TNF } \alpha$ 。

【0315】 實施例 21：TREM-1 抗體特異性抑制類風濕性關節炎滑液誘導之反應

【0316】 如實施例 6 中所述，在 BWZ 報導體檢定中，針對 TREM-1 配位體活性檢定罹患類風濕性關節炎之患者的 RA 滑液樣品。簡言之，將滑液解凍，渦旋且連續稀釋，使用添加有 TREM-1 抗體或陰性同型對照物的 +/-10 $\mu\text{g/ml}$ PGNECndi (Invivogen, San Diego, CA, USA) 一式兩份地進行檢定。類風濕性關節炎患者的滑液能夠以 TREM-1 依賴性方式觸發 BWZ/hTREM-1 報導細胞檢定，其藉由添加 MAB1278 (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA；目錄號 MAB1278) 可進一步增強，而本文揭示之阻斷性 TREM-1 抗體能夠降低此活化。

【0317】 在以下兩欄所指明之兩個檢定中測試抗體，各抗體的濃度範

圍為 0.1 μ g/ml 至 10 μ g/ml。MAB1278 明顯地增強信號，而 mAb 0122 及 0170 降低信號（相較於同型對照物）。

【0318】 表 17

濃度	+ mAb 0122		+ mAb 0170		+ mAb 1278		+ IgG4 同型對照物	
10 μ g/ml	80877	79731	52064	50304	1079000	1054000	306906	397556
1 μ g/ml	74191	66458	48254	46978	1192000	1023000	398431	363267
0.1 μ g/ml	133900	163521	246695	169483	828866	691379	293831	313445

【0319】 實施例 22：mAb 0170 可阻斷細胞激素自 PGLYRP-1 刺激之類風濕性關節炎患者之滑液組織細胞釋放

【0320】 滑液組織樣品獲自全膝關節置換術期間的 RA 患者。藉由 4 mg/ml 膠原蛋白酶（目錄號 11088793001，Roche, Mannheim, Germany）及 0.1 mg/ml 脫氧核糖核酸酶（目錄號 11284932001，Roche, Mannheim, Germany）在 37°C 消化 1 小時來分離滑液組織細胞之單一懸浮液。

【0321】 以 1×10^5 個/孔存於培養基 RPMI（目錄號 R0883，St Louis, MO, USA）+10% FCS（目錄號 S0115，BioChrom AG, Grand Island, NY 14072, USA）中的滑液組織細胞在低氧條件下，在各種濃度之 mAb 0170 或同型 hIgG4 對照物存在或不存在下，用 4 μ g/ml PGLYRP1 及 1 μ g/ml PGN-ECNDi（目錄號 tlr1-kipgn，Invivogen, San Diego, CA 92121, USA）刺激。培育 24 小時之後，收集細胞上清液，且藉由 ELISA（TNF α （目錄號 DY210，R&D, Minneapolis, MN55413 USA）、IL-1b（88-7010-88，eBioscience, San Diego, CA 92121, USA）、GM-CSF（目錄號 88-7339-88，eBioscience）或 Flowcytomix（TNF α 、IL-1b、MIP-1b、MCP-1、IL-6 及 IL-8（目錄號 BMS, eBioscience））量測細胞激素。滑液組織細胞經 TREM-1 配位體刺激而分泌細胞激素且被 TREM-1 抗體 mAb 0170 特異性阻斷。

【0322】 以下為此實驗之實施例，其中使用 4 ng/ml 或 10 ng/ml mAb，

從而在用 TREM-1 抗體 mAb 0170 處理時，減少細胞激素釋放。

【0323】 表 18

細胞激素 (pg/ml)	PGN	PGN+ PGLYRP1	PGN+PGLYRP1+ 10 ng/ml 對照物	PGN+PGLYRP1+ 10 ng/ml mAb 0170
TNF α	624	1445	1034	429
MIP-1 β	2458	4395	3791	2321
MCP-1	273	471	391	210

【0324】 表 19

細胞激素 (pg/ml)	PGN	PGN+ PGLYRP1	PGN+PGLYRP1+ 4 ng/ml 對照物	PGN+PGLYRP1+ 4 ng/ml 0170
IL-1 β	2419	3773	3477	2308
GM-CSF	182	616	656	431
IL-6	2057	4189	3475	1632
IL-8	2575	5509	4499	2112

【0325】 此實施例顯示，類風濕性關節炎患者之滑液組織細胞對 TREM-1 配位體 PGLYRP1 刺激有反應，此反應為分泌很多細胞激素，mAb 0170 可抑制此分泌。

【0326】 實施例 23：TREM-1 抗體 mAb 0170 可阻斷 II 型 PGLYRP1 誘導之類風濕性關節炎患者滑液組織細胞釋放 TNF α

【0327】 滑液組織樣品獲自全膝關節置換術期間的 RA 患者。藉由 4 mg/ml 膠原蛋白酶（目錄號 11088793001，Roche, Mannheim, Germany）及 0.1 mg/ml 脫氧核糖核酸酶（目錄號 11284932001，Roche, Mannheim, Germany）在 37°C 消化 1 小時來分離滑液組織細胞之單一懸浮液。將滑液組織細胞（以 1×10^5 個/孔存於培養基 RPMI（目錄號 22400105，Gibco, NY 14072, USA）+10% FCS（目錄號 S0115，BioChrom AG, Berlin, Germany）中）與各種劑量之經 II 型 PGLYRP1 瞬間轉染之 HEK 細胞在低氧條件下在 1 μ g/ml mAb 0170 或 IgG4 同型對照物存在或不存在下共培養。培育 24 小時之後，收集細胞上清

液，且藉由 TNF α ELISA (目錄號 DY210, R&D, Minneapolis, MN55413 USA) 量測細胞激素。

【0328】 表 20

II 型 PGLYRP1 (HEK 轉染) / 對照 HEK	TNF- α (pg/ml) 釋放					
	1×10^5	3×10^4	1×10^4	3×10^3	1×10^3	0
IgG4+ II 型細胞	121.17	114.08	95.02	54.56	57.87	33.47
IgG4+對照細胞	55.65	63.73	57.99	33.78	36.40	36.32
mAb 0170+II 型細胞	44.05	44.67	44.40	39.45	44.29	31.40
mAb 0170+對照細胞	54.50	57.06	53.10	42.10	31.99	27.82

【0329】 此實施例顯示，TREM-1 配位體 (II 型細胞) 誘導 TNF- α 以劑量依賴性方式自類風濕性關節炎患者之滑液組織細胞釋放 (相較於對照細胞 (模擬轉染))。此 TNF α 反應被 mAb 0170 而非同型 IgG4 阻斷。對照細胞不受影響。

【0330】 實施例 24：盤結合型 MAB1278 誘導巨噬細胞中之 IL-6 及 TNF α 反應，顯示促效特徵，而 mAb 0122 及 0170 則不然。

【0331】 盤結合型促效性抗 TREM-1 抗體刺激巨噬細胞誘導 IL-6 及 TNF α 之產生。使用 RosetteSep (StemCell Technologies, 15068) 自健康供者之白血球層純化出單核細胞且藉由在 RPMI/10% FBS 中、在 40 ng/ml 人類 MCSF 存在下培養 6 天來分化成巨噬細胞。接著藉由將培養基更換為補充有 50 ng/ml 人類 IL-4 之生長培養基且返回至恆溫箱中另維持 24 小時來使巨噬細胞進一步分化為 M2 巨噬細胞。第七天，藉由用 1X PBS 洗滌、隨後用含有 5 mM EDTA 之 PBS 洗滌來自培養盤中回收巨噬細胞。接著將培養盤恢復至 37°C 維持 30 分鐘，隨後將巨噬細胞自盤中洗去。巨噬細胞於 RPMI/10% FBS 中洗滌，隨後再懸浮且塗鋪。測試孔藉由與 PBS 中稀釋之抗體培育隔夜、隨後於 PBS 中洗滌 3 次而已經指定抗體預塗。再懸浮的巨噬細胞以 5×10^5 個細胞/毫升一式三份地塗鋪於測試孔中，隨後培育 24 小時。(分化

及刺激細胞之所有步驟皆在正常大氣含氧量（氧正常）下、在 37°C、5% CO₂ 恆溫箱中進行）。接著收集上清液且使用 BioPlex（Bio-Rad, 171-B5006M 及 171-B5026M）分析 IL-6 及 TNF α 。

【0332】 抗體 mAb-0122 及 mAb-0170 顯示極低的促效作用，而 MAB1278 抗體（RnD Systems, MAB1278）對 IL-6 與 TNF α 均顯示有效的誘導作用。

【0333】 表 21

盤結合型 mAb 刺激：	IL-6 pg/ml		TNF α pg/ml	
	平均值	標準差	平均值	標準差
無抗體	1	3	0.3	0.8
mIgG1 同型對照物 2 μ g/ml	0	0	0	0
mIgG1 同型對照物 6 μ g/ml	0	0	0	0
mIgG1 同型對照物 20 μ g/ml	14	24	5	5
MAB1278 2 μ g/ml	412	71	2004	451
MAB1278 6 μ g/ml	877	38	6454	278
MAB1278 20 μ g/ml	1352	76	7753	555
hIgG4 同型對照物 2 μ g/ml	5	5	2	1
hIgG4 同型對照物 6 μ g/ml	18	15	9	9
hIgG4 同型對照物 20 μ g/ml	37	3	34	1
mAb 0122 2 μ g/ml	93	48	59	18
mAb 0122 6 μ g/ml	126	8	105	17
mAb 0122 20 μ g/ml	234	10	304	26
mAb 0170 2 μ g/ml	137	29	76	21
mAb 0170 6 μ g/ml	181	12	187	28
mAb 0170 20 μ g/ml	277	15	629	108

【0334】 此實施例說明 mAb-0122 及 mAb-0170 對巨噬細胞僅顯示極低的促效活性且表明此等 mAb 之真實阻斷特徵。

【0335】 實施例 25：在小鼠關節炎模型中阻斷 TREM-1 可減少疾病

【0336】 表 22 中概述之實驗係以 DTH 關節炎模型獲得，該模型為單爪關節炎模型。在雌性 C57BL/6 小鼠中，藉由免疫作用在右後爪中引發典型遲緩型超敏性（DTH）反應及隨後用甲基化牛血清白蛋白（mBSA）攻擊而誘導單爪關節炎，改變之處為在免疫與攻擊步驟之間靜脈內投予 II 型膠

原蛋白單株抗體(抗 CII)混合液。左後爪接受 PBS 攻擊且充當動物內對照。小鼠(10 隻小鼠/組)用 TREM 單株抗體每週處理 3 次，TREM 單株抗體特异性結合且阻斷鼠科 TREM-1，如使用實施例 6 中所述之鼠科型式之報導體檢定所測定。免疫當天投予第一劑量。小鼠(9 至 10 隻小鼠/組)用對照抗體或 PBS 處理作為對照。自關節炎誘發之日起直至第 11 天量測爪腫脹。結果以曲線下平均面積(AUC)±SEM 提供。統計顯著性係利用雙側不成對 t 檢驗(95%信賴區間)檢驗。

【0337】 表 22: TREM-1 處理對小鼠關節炎模型之爪腫脹(AUC-mm)的影響

影響量度	實驗	TREM-1 mAb [§]	對照 mAb [§]	PBS
AUC-mm 爪腫脹	#1	8.03 +/- 1.01**	12.26 +/- 0.84	12.53 +/- 0.87
AUC-mm 爪腫脹	#2	8.45 +/- 0.94**	11.71 +/- 0.22	12.89 +/- 0.36
平均值± SEM.				
§ 小鼠用 5 mg/kg 處理，每週 3 次，持續 3 週				
**P≤ 0.005，雙側不成對 t 檢驗，95%信賴區間，相對於對照 mAb 及相對於 PBS				

【0338】 實施例 26: TREM-1 mAb 可阻斷經活化之嗜中性白血球釋放 IL-8

【0339】 嗜中性白血球表現 TREM-1 且嗜中性白血球亦表現 TREM-1 配位體。為測試 TREM-1 是否涉及嗜中性白血球中之自分泌刺激迴路，用 PGN-SA (InVivogen, tlr1-pgnsa) 刺激所分離的嗜中性白血球，且量測 IL-8 在培養基中的釋放。TREM-1 抗體 mAb-0059、mAb-0067、mAb-0122 及 mAb-0170 能夠降低 PGN-SA 誘導之 IL-8 釋放。自健康人類供者全血中分離出嗜中性白血球且以 1.5×10E6 個細胞/毫升再懸浮於 RPMI/10% FBS 中，且一式三份地塗鋪於經血纖維蛋白原預塗之測試孔(經 50 μl 含有 1 mg/ml 血纖維蛋白原(Sigma, F3879)之 PBS 在 37°C 預塗 2 小時，隨後於 PBS 中洗滌 3 次)中。細胞在以下條件下測試：不添加刺激物；僅 10 μg/ml PGN-SA，或 10 μg/ml

PGN-SA (在 0.25 μ g/ml mAb-0059、mAb-0067、mAb-0122、mAb-0170 或同型對照抗體存在下)。樣品在 37°C、5% CO₂ 恆溫箱中培養 24 小時。接著收集上清液且使用 Bio-plex Pro 人類細胞激素 IL-8 集合 (BioRad, 171-B5008M) 針對 IL-8 加以分析。

【0340】 表 23

實驗 1 經以下刺激之嗜中性 白血球：	IL-8, pg/ml		實驗 2 經以下刺激之嗜中性 白血球：	IL-8, pg/ml	
	平均值	標準差		平均值	標準差
無添加	N.D.	N.D.	無添加	857	214
PGN-SA	562	54	PGN-SA	6116	191
PGN-SA + hIgG1.1 同 型對照物	461	80	PGN-SA + hIgG4 同型 對照物	6530	1962
PGN-SA+mAb 0059	165	55	PGN-SA+mAb 0122	2466	437
PGN-SA+mAb 0067	183	77	PGN-SA+mAb 0170	2171	480

【0341】 此實施例說明 TREM-1 抗體可減少 IL-8 自細菌源 PGN 刺激誘導之嗜中性白血球釋放。從而證明 TREM-1 涉及嗜中性白血球之自分泌活化迴路，且 TREM-1 抗體潛在地適用於下調嗜中性白血球反應。

【0342】 實施例 27：經活化之嗜中性白血球可刺激單核細胞，此可由抗 TREM-1 mAb 阻斷

【0343】 經活化之嗜中性白血球表現 TREM-1 配位體。為測試經活化之嗜中性白血球是否可以 TREM-1 依賴性方式刺激其他免疫細胞，使用經活化之嗜中性白血球刺激所分離的單核細胞且量測 TNF α 在培養基中的釋放。TREM-1 抗體 mAb-0059 及 mAb-0170 能夠降低嗜中性白血球誘導單核細胞釋放 TNF α 。

【0344】 自人類健康供者全血中分離出嗜中性白血球且再懸浮於 RPMI/10% FBS 中，且以 1.5×10⁵ 個細胞/孔塗鋪於經聚-D-離胺酸塗佈之 96 孔組織培養盤 (Corning, 3841) 中。嗜中性白血球接著在 37°C、5% CO₂ 恆溫箱中用 1 ng/ml PMA (Sigma, P1585) + 20 μ g/ml PGN-SA (InVivogen, tlrl-pgnsa)

刺激 24 小時。細胞接著用培養基輕緩洗滌 3 次，隨後添加剛分離之單核細胞。使用 EasySep 套組（Stem cell technologies, 19059）自健康供者白血球層純化出單核細胞，且以 5×10^4 個細胞/孔塗鋪於已含有經洗滌之活化嗜中性白血球的孔中。添加 $1 \mu\text{g/ml}$ 之以下抗體：mAb-0059、mAb-0170 或 hIgG4 同型對照物。接著將細胞另培養 24 小時，隨後收集上清液。上清液於 RPMI/10% FNS 中 1:10 稀釋，隨後藉由 ELISA（eBioscience, BMS223INST）量測 $\text{TNF } \alpha$ 。

【0345】 表 24

經以下刺激之單核細胞：	$\text{TNF } \alpha \text{ pg/ml}$	
	平均值	標準差
無嗜中性白血球	34	85
經活化之嗜中性白血球	299	67
經活化之嗜中性白血球+同型對照物	232	32
經活化之嗜中性白血球+ mAb 0059	72	14
經活化之嗜中性白血球+ mAb 0170	129	9

【0346】 此實施例說明經活化之嗜中性白血球可以 TREM-1 依賴性方式刺激單核細胞產生 $\text{TNF } \alpha$ ，且此可由 mAb-0059 及 mAb-0170 抗 TREM-1 抗體阻斷。因此抗 TREM-1 抗體潛在適用於下調單核細胞反應。

【0347】 雖然本發明之某些特徵已在本文中加以說明及描述，但許多修改、取代、變化及等效物對一般技術者而言現為顯而易見的。因此應瞭解，希望所附申請專利範圍涵蓋屬於本發明之真實精神範圍內的所有此等修改及變化。

【符號說明】

【0348】

無

序列表

<110> 諾佛 儂迪克股份有限公司
<120> 會結合及阻斷表現在骨髓細胞-1(TREM-1)上觸發受體之抗體
<130> 8492
<160> 23
<170> 專利第 3.5版
<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> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 3

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser 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 Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 4
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化TREM-1抗體之重鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(448)
<223> 人類化TREM-1抗體之重鏈

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化TREM-1抗體之輕鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(218)
<223> 人類化TREM-1抗體之輕鏈

<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 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> 6
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化TREM-1抗體之重鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(448)
<223> 人類化TREM-1抗體之重鏈

<400> 6

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 Gln 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> 7
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化TREM-1抗體之輕鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(218)
<223> 人類化TREM-1抗體之輕鏈

<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

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> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8

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

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

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

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

Ser Val Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 9

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

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

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

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

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

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

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 11

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser 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 Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 12
<211> 180
<212> PRT
<213> 長尾獼猴

<400> 12

Met Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys Glu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr Ala Asn Ser
20 25 30

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

Lys Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg
50 55 60

Ile Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln Val Gln Met
65 70 75 80

Thr Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr
85 90 95

Gln His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile Cys Leu Val
100 105 110

Val Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu Asn Ser Thr
115 120 125

Gln Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala Leu Gly Pro
130 135 140

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

Val Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr
165 170 175

Asp Ile Ile Arg
180

<210> 13
<211> 206
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6

<400> 13
Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Leu Asp Val Ala Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln
20 25 30

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

Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg
50 55 60

Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met
65 70 75 80

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

Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val
100 105 110

Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr
115 120 125

Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro
130 135 140

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

Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr
165 170 175

Asp Ile Ile Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln
180 185 190

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
195 200 205

<210> 14
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A24/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6

<400> 14
Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln
20 25 30

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

Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg Ile
50 55 60

Thr Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Gln Val Gln Met Thr
65 70 75 80

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

His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile Cys Leu Val Val
100 105 110

Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu Asn Ser Thr Gln
115 120 125

Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala Leu Gly Pro Arg
130 135 140

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

Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr Asp
165 170 175

Ile Ile Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys
180 185 190

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
195 200 205

<210> 15
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6
<400> 15

Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln
20 25 30

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

Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg Ile
50 55 60

Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln Val Gln Met Thr
65 70 75 80

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

His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile Cys Leu Val Val
100 105 110

Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu Asn Ser Thr Gln
115 120 125

Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala Leu Gly Pro Arg
130 135 140

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

Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr Asp
165 170 175

Ile Ile Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys
180 185 190

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
195 200 205

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 16
tagtagggat ccgctggtgc acaggaagg 29

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 17
tagtaggcgg ccgcttcgtg ggcctagggt ac 32

<210> 18
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hTREM-1-IgV-His6

<400> 18

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 His His His His His His
130 135 140

<210> 19
<211> 205
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cTREM-1-Cmyc2-His6

<400> 19

Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr Ala Asn Ser Arg
20 25 30

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

Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg Ile
50 55 60

Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln Val Gln Met Thr
65 70 75 80

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

His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile Cys Leu Val Val
100 105 110

Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu Asn Ser Thr Gln
115 120 125

Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala Leu Gly Pro Arg
130 135 140

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

Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr Asp
165 170 175

Ile Ile Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys
180 185 190

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
195 200 205

<210> 20
<211> 206
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hTREM-1-Cmyc2-His6

<400> 20

Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln
20 25 30

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

Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg
50 55 60

Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met
65 70 75 80

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

Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val
100 105 110

Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr
115 120 125

Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro
130 135 140

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

Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr
165 170 175

Asp Ile Ile Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln
180 185 190

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
195 200 205

<210> 21
<211> 233
<212> PRT
<213> 長尾獼猴

<400> 21
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> 22
<211> 230
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 22
Met Arg Lys Ala Gly Leu Trp Gly Leu Leu Cys Val Phe Phe Val Ser
1 5 10 15
Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Leu Glu Glu Glu Arg Tyr Asp Leu Val
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Thr Val Lys Cys Pro Phe Asn Ile Met Lys Tyr
35 40 45

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

Leu Thr Leu Val Val Thr Gln Arg Pro Phe Thr Arg Pro Ser Glu Val
65 70 75 80

His Met Gly Lys Phe Thr Leu Lys His Asp Pro Ser Glu Ala Met Leu
85 90 95

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

Cys Val Ile Tyr His Pro Pro Asn Asp Pro Val Val Leu Phe His Pro
115 120 125

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

Ile Ile Pro Ile Thr Arg Leu Thr Glu Arg Pro Ile Leu Ile Thr Thr
145 150 155 160

Lys Tyr Ser Pro Ser Asp Thr Thr Thr Thr Arg Ser Leu Pro Lys Pro
165 170 175

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

Thr Asp Ala Asp Ser Val Ser Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Ile
195 200 205

Cys Gly Leu Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ile Ile Leu Phe Ile Val
210 215 220

Thr Lys Arg Thr Phe Gly
225 230

<210> 23
<211> 175
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

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

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

Leu Arg Tyr Val Val Val Ser His Thr Ala Gly Ser Ser Cys Asn Thr
35 40 45

Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val Gln His Tyr His Met
50 55 60

Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn Phe Leu Ile Gly Glu
65 70 75 80

Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn Phe Thr Gly Ala His
85 90 95

Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly Ile Ser Phe Met Gly
100 105 110

Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala Ile Arg Ala Ala Gln
115 120 125

Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ser Asn Tyr
130 135 140

Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn
145 150 155 160

Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro
165 170 175

申請專利範圍

1. 一種抗體或其片段，其能夠特異性結合至表現在骨髓細胞上觸發受體-1 (TREM-1) 並結合至包含 SEQ ID NO: 1 (人類 TREM-1) 之胺基酸殘基 D38、V39、K40、C41、D42、Y43、T44 及 L45 中之 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個或全部及胺基酸殘基 E46、K47、F48 中之 1 個、2 個或全部的抗原決定基，且該抗體可阻斷 TREM-1 活化。

2. 如申請專利範圍第 1 項之抗體或其片段，其中該抗體為 mAb 0170，其包含含有 SEQ ID NO: 4 之序列的重鏈以及含有 SEQ ID NO: 5 之序列的輕鏈。

3. 如申請專利範圍第 1-2 項中任一項之抗體或其片段，其重鏈包含對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸殘基 31 至 35 (TYAMH) 的 CDRH1 序列；及/或對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸殘基 50 至 68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) 的 CDRH2 序列；及/或對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸殘基 101 至 110 (DMGIRRQFAY) 的 CDRH3 序列；且其輕鏈包含對應於 SEQ ID NO: 5 之胺基酸殘基 24 至 38 (RASESVDTFDYSFLH) 的 CDRL1 序列；及/或對應於 SEQ ID NO: 5 之胺基酸殘基 54 至 60 (RASNLES) 的 CDRL2 序列；及/或對應於 SEQ ID NO: 5 之胺基酸殘基 93 至 101 (QQSNEDPYT) 的 CDRL3 序列。

4. 一種用作醫藥品之如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之抗體或其片段。

公告本

圖式

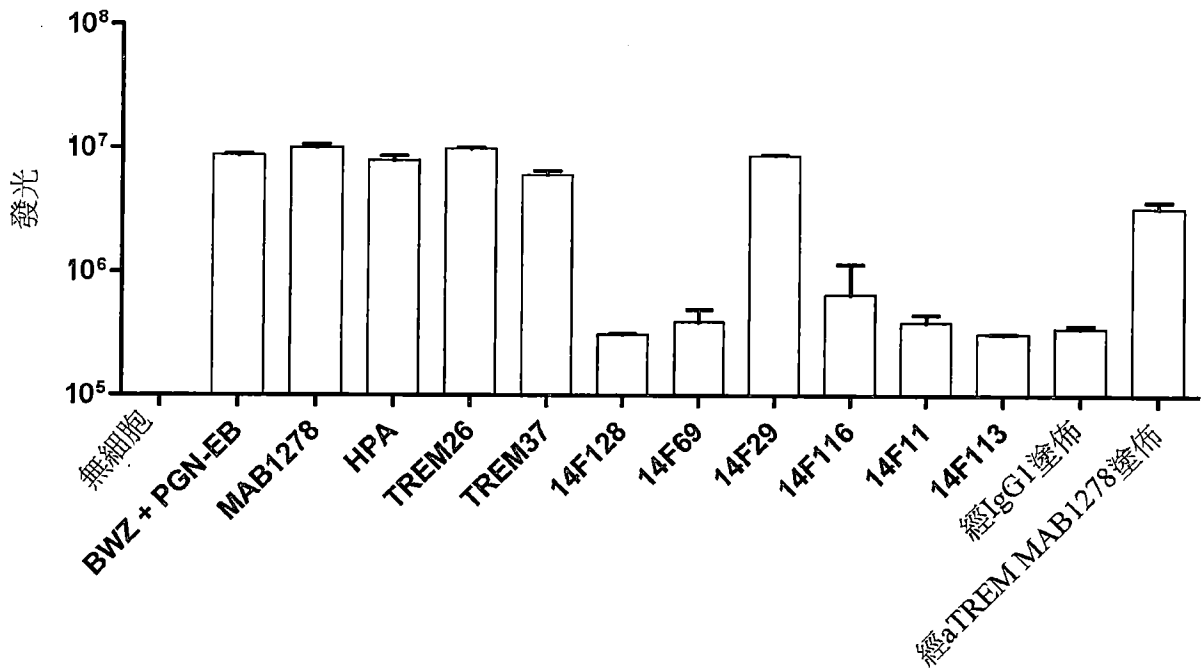


圖1

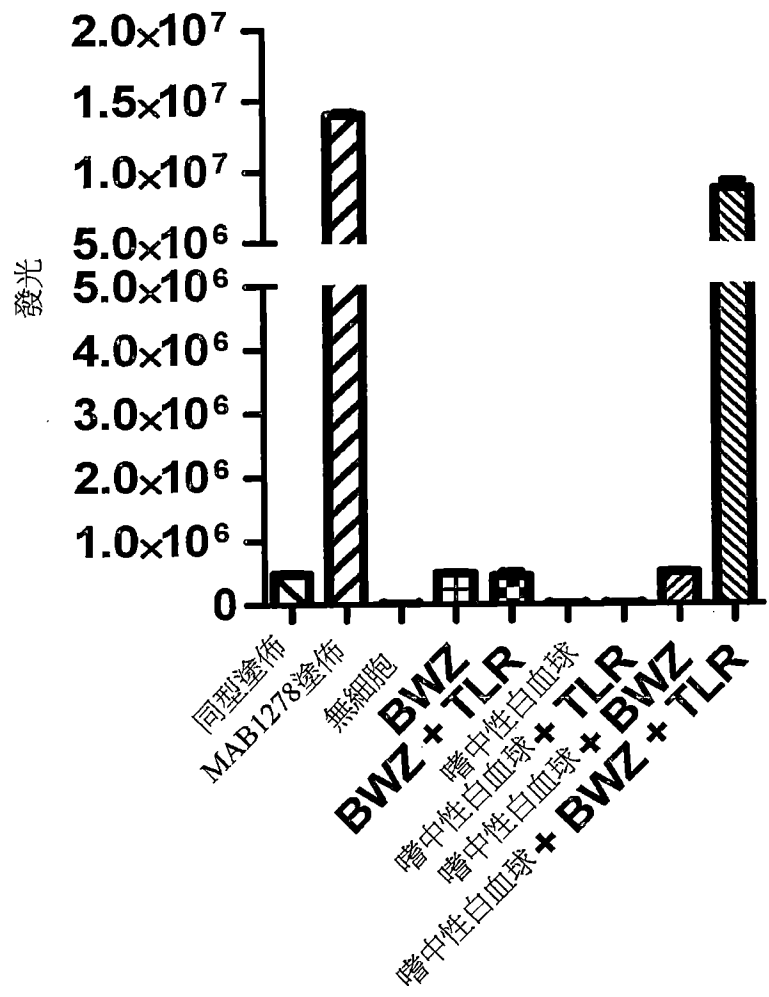


圖2

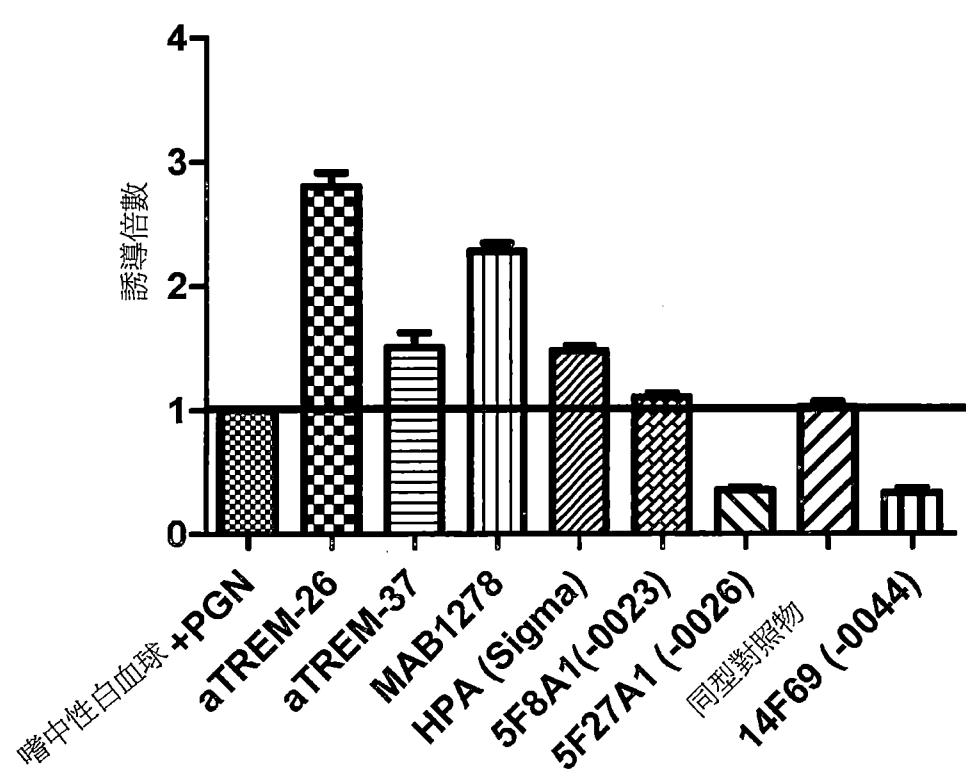


圖3

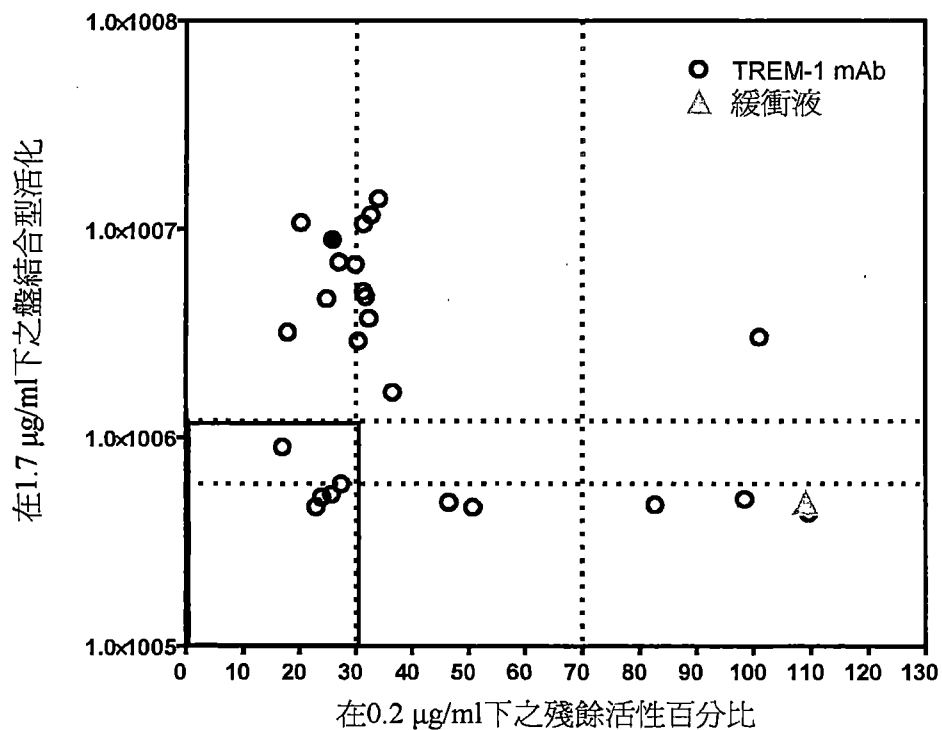


圖4

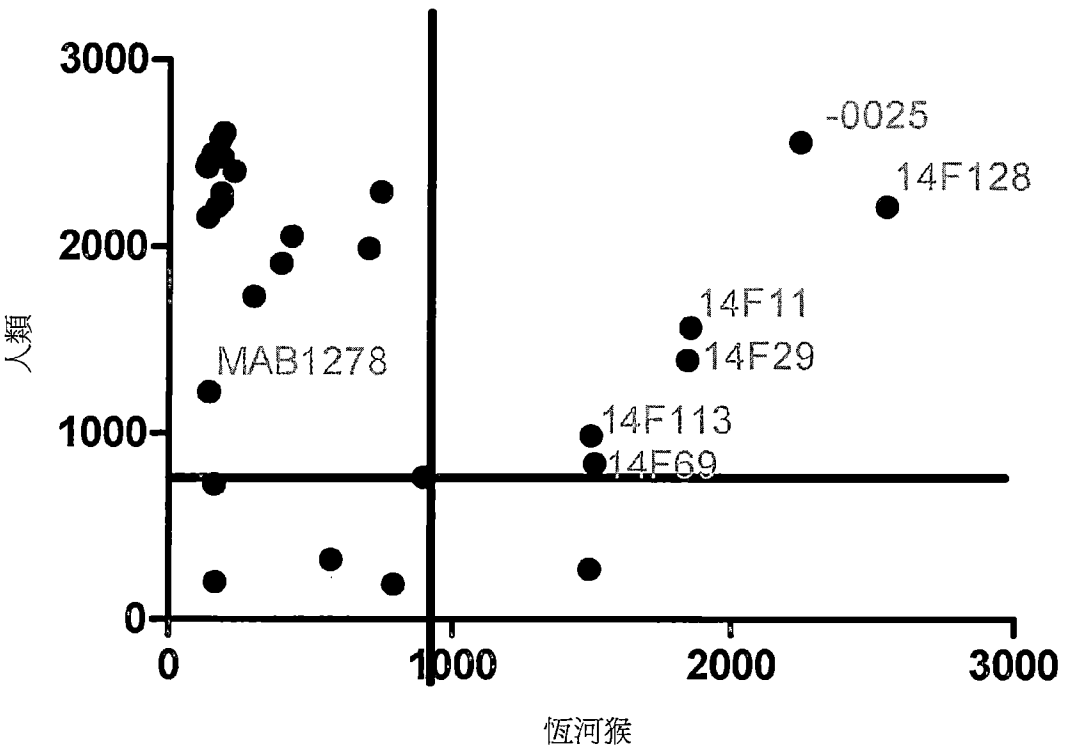


圖5

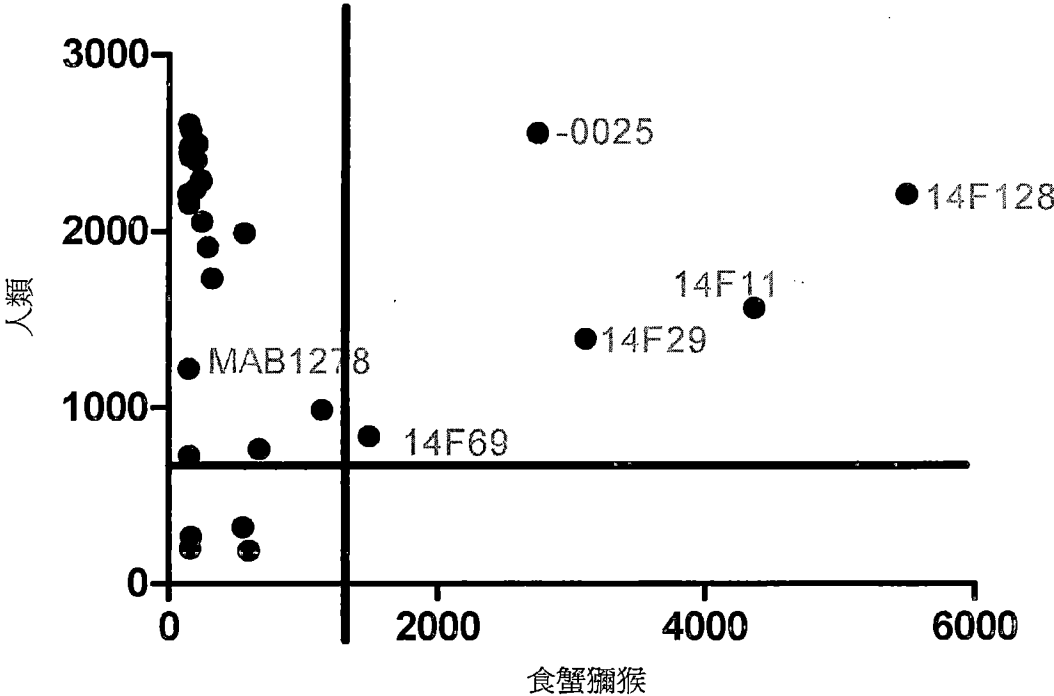


圖6A

對食蟹獼猴單核細胞滴定mAb 0170

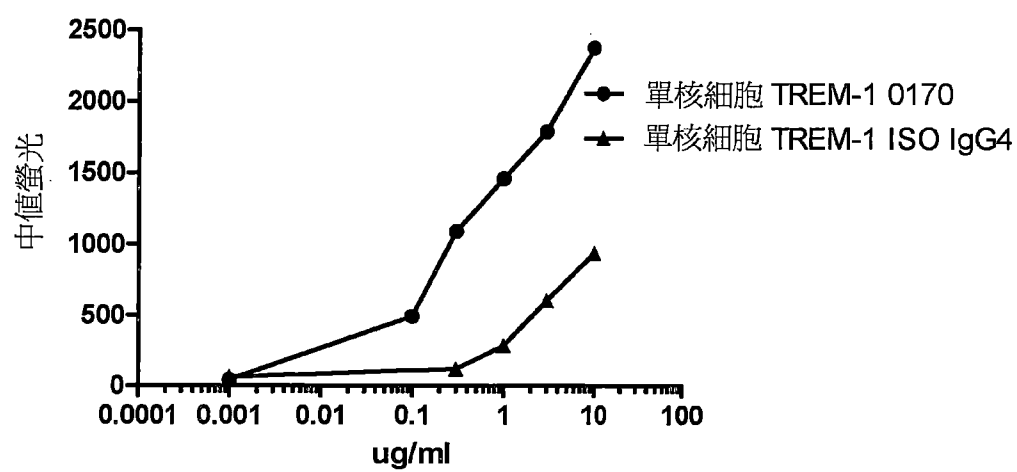


圖6B

對人類單核細胞滴定mAb 0170

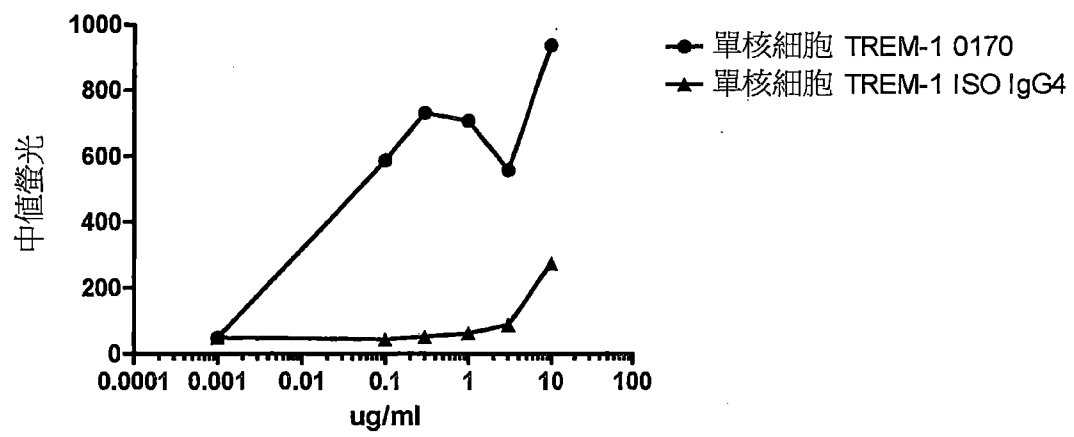


圖6C



圖7A

21 58
ATKLTEEKYELKEGQTL DVKCDY TLEKF ASSQKAWQII

59 96
RDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL

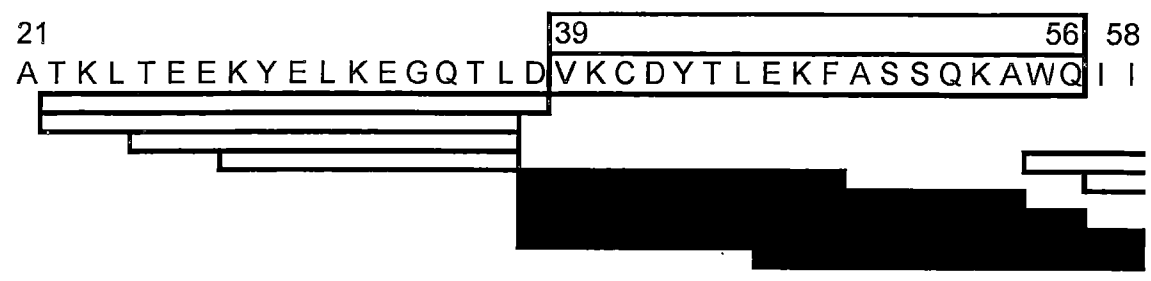
97 104 112 131
RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRL

132 167
VVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYT

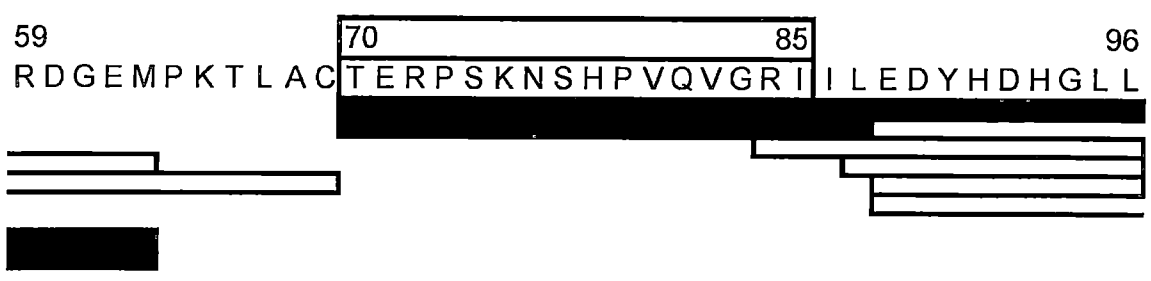
168 200
SPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIR

圖7B

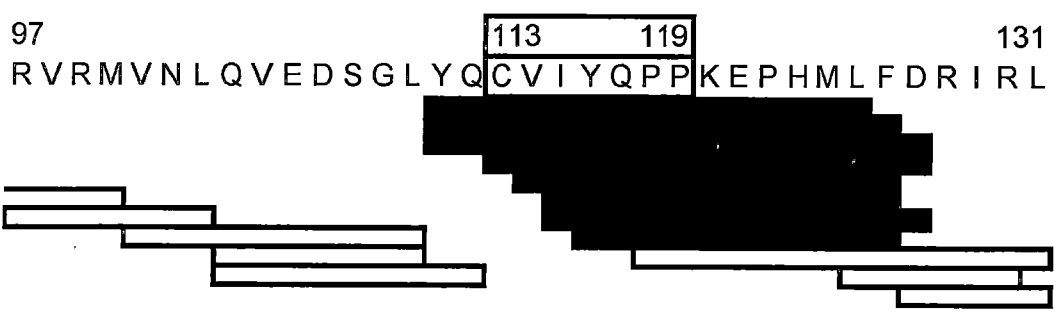
21 39 56 58
ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLEKFASSQKAWQII



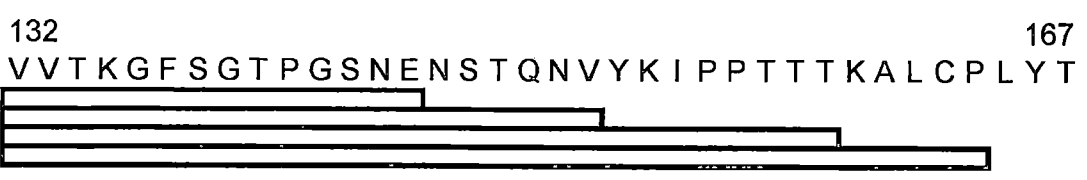
59 70 85 96
RDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLL



97 113 119 131
RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRI RL



132 167
VVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYT



168 200
SPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIR

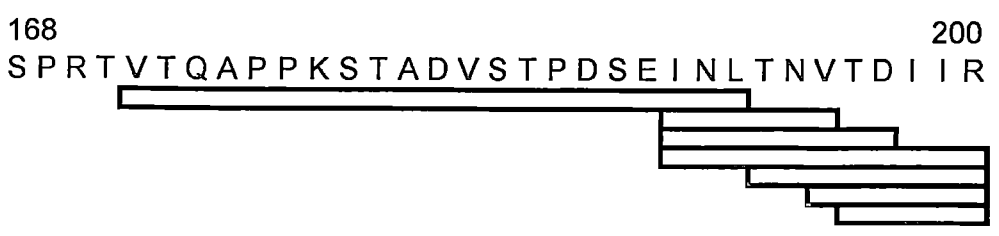
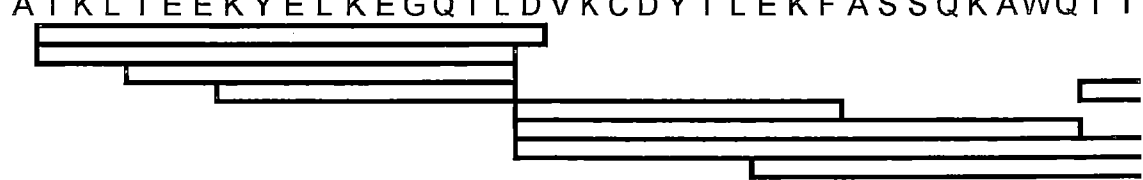


圖7C

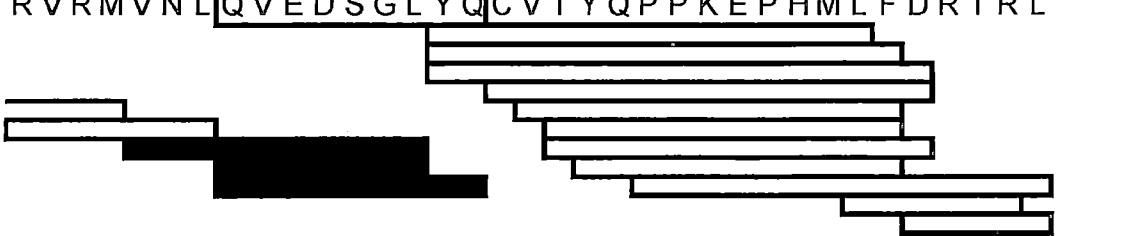
21 58
ATKLTEEKYELKEGQTL DVKCDYTL EKFASSQKAWQII



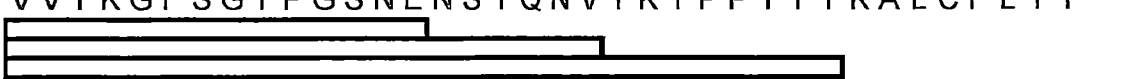
59 70 85 96
RDGEMPKTLAC TERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL



97 104 112 131
RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRL



132 167
VVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYT



168 200
SPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIR

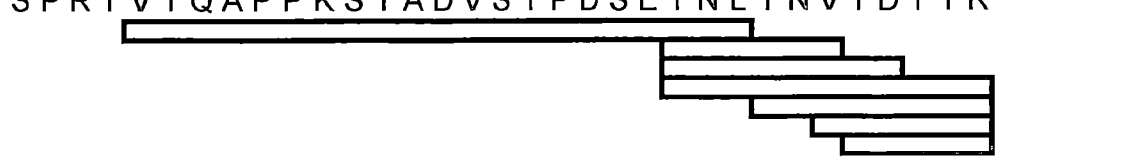


圖7D

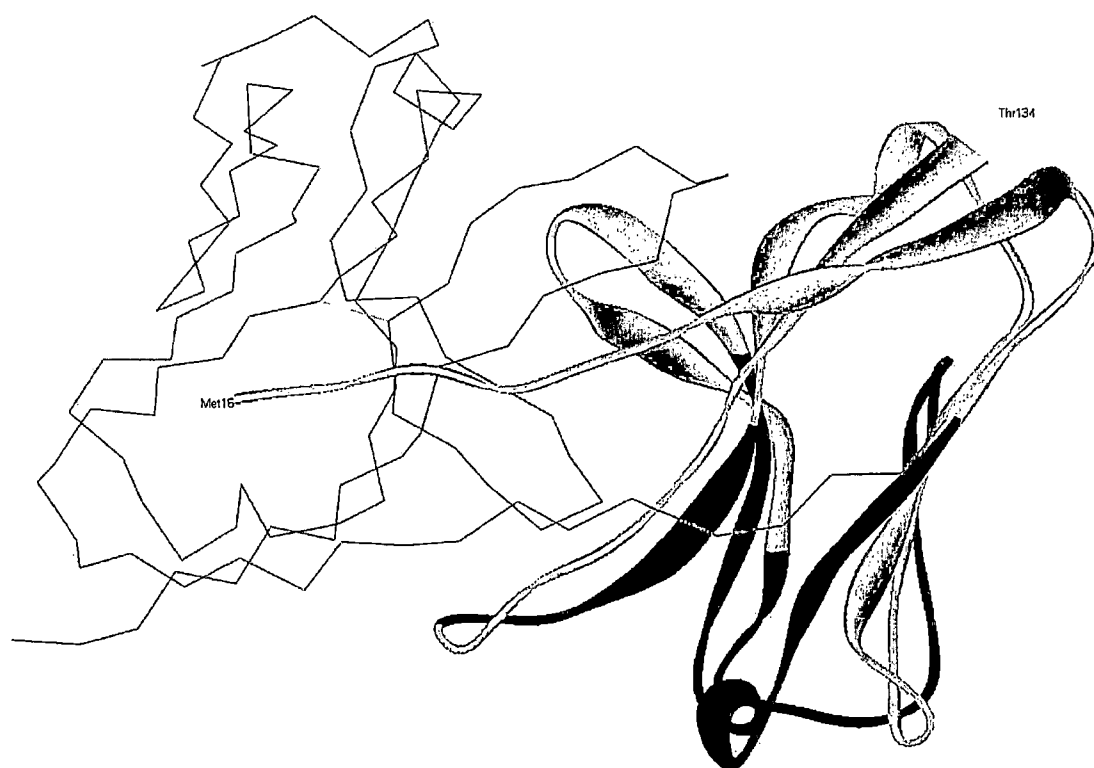


圖8

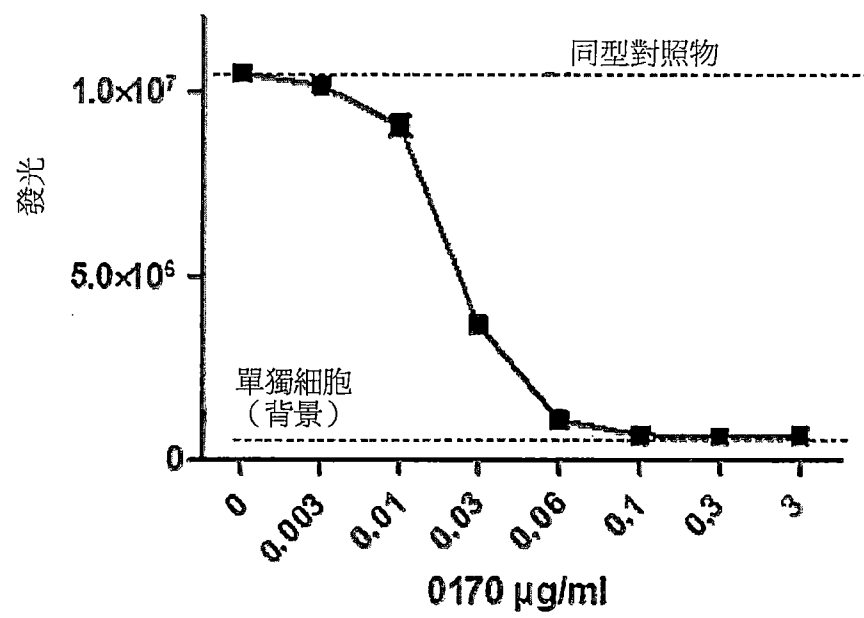


圖9

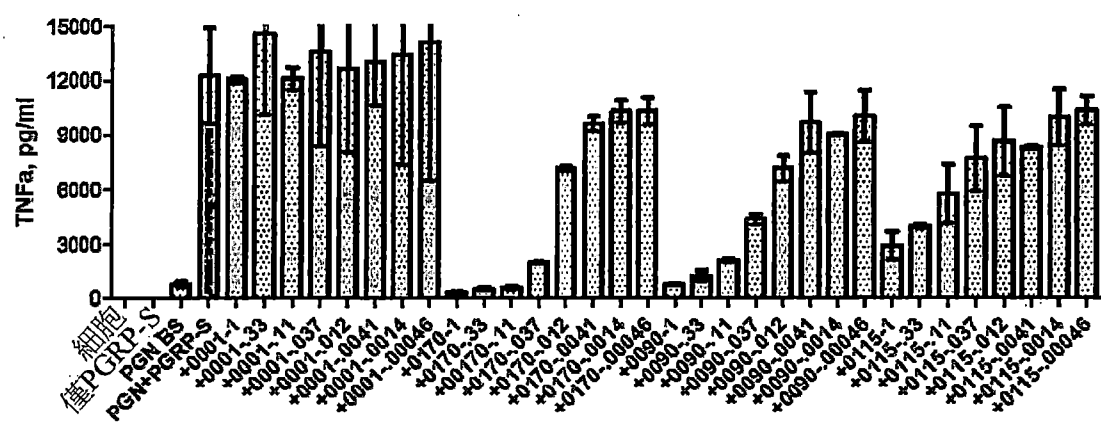


圖10

	2	3	4	5	6	7
	78901234567890123456789012345678901234567890123456					
人類TREM-1	ELRAATKLT E E K Y E L K E G Q T L D V K C D Y T L E K F A S S Q K A W Q I I R D G E M P K T L A C T E R P S K N					
食蟹獼猴TREM-1	T T E L T E E K Y E Y K E G Q T L E V K C D Y A L E K Y A N S R K A W Q K M - E G K M P K I L A K T E R P S E N					
	*:***** *****:*****:***:*.*.***** :*:*** ** *****:*					
	8	9	10	11	12	13
	789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456					
人類TREM-1	S H P V Q V G R I I L E D Y H D H G L L R V R M V N L Q V E D S G L Y Q C V I Y Q P P K E P H M L F D R I R L V V T K G					
食蟹獼猴TREM-1	S H P V Q V G R I T L E D Y P D H G L L Q V Q M T N L Q V E D S G L Y Q C V I Y Q H P K E S H V L F N P I C L V V T K G					
	***** **** *****.*.*.***** ***** ***.*:*: * *****					
	14	15	16	17	18	19
	789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456					
人類TREM-1	F S G T P G S N E N S T Q N V Y K I P P T T T K A L C P L Y T S P R T V T Q A P P K S T A D V S T P D S E I N L T N V T					
食蟹獼猴TREM-1	S S G T P G S S E N S T Q N V Y R T P S T T A K A L G P R Y T S P R T V T Q A P P E S T V V V S T P G S E I N L T N V T					
	*****.*****.*.*:*** * *****:***. ****.*****					
	20					
	7890					
人類TREM-1	D I I R					
食蟹獼猴TREM-1	D I I R					

圖11