

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046142**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092302

(22) Дата подачи заявки
2019.04.01

(54) **АНТИТЕЛА К TREM-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/651,605**

(32) **2018.04.02**

(33) **US**

(43) **2021.02.02**

(86) **PCT/US2019/025100**

(87) **WO 2019/195126 2019.10.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(56) **WO-A1-2016009086**

WARNCKE M. ET AL.: "Different adaptations of IgG effector function in human and nonhuman primates and implications for therapeutic antibody treatment", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, INC, US, vol. 188, № 9, 1 May 2012 (2012-05-01), p. 4405-4411, XP002745516, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1200090 [retrieved on 2012-03-28], cited in the application, p. 4405

(72) Изобретатель:
**Пашине Ачал, Госслин Майкл Л.,
Ямнюк Аарон П., Холмс Дерек А.,
Чэнь Годун, Мадия Приянка Апурва,
Хуан Ричард Юйчэн, Карл Стивен
Майкл (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В изобретении описаны антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с TREM-1 и ингибируют передачу сигнала TREM-1, где антитела не связываются с одним или несколькими FcγR и не индуцируют продуцирование миелоидными клетками провоспалительных цитокинов. Описаны также применения таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов в терапии, например, при лечении аутоиммунных заболеваний.

B1

046142

046142

B1

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде на сайте EFS-WEB

Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в виде текстового файла в кодировке ASCII (название: 3338_092PC01_SeqListing.txt; размер: 106162 байтов; и дата создания: 27 марта 2019 г.), сформированного при создании заявки, полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Предпосылки создания изобретения

TREM-1 представляет собой активирующий рецептор, который экспрессируется на моноцитах, макрофагах и нейтрофилах. Эти клетки играют центральную роль при хронических воспалительных заболеваниях, высвобождая цитокины и другие медиаторы, участвующие в воспалении. мРНК TREM-1 и экспрессия белка подвергаются повышающей регуляции у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и воспалительным заболеванием кишечника (IBD), и TREM-1-позитивные клетки накапливаются в местах воспаления, что коррелирует с серьезностью заболевания (см. Bouchon и др., Nature, 410, 2001, с. 1103-1107; Schenk и др., Clin Invest, 117, 2007, с. 3097-3106; и Kuai и др., Rheumatology, 48, 2009, с. 1352-1358). Пептидогликан-распознающий белок 1 (PGLYRP1), экспрессируемый в основном активированными нейтрофилами, представляет собой лиганд для TREM-1, и после связывания он опосредует передачу сигнала TREM-1.

In vitro участие TREM-1 запускает секрецию провоспалительных цитокинов, включая TNF, IL-8 и моноцитарный хемотаксический белок-1. Кроме того, передача сигнала TREM-1 синергетически взаимодействует с многочисленными Толл-подобными рецепторами (TLR), дополнительно усиливая провоспалительные сигналы. В свою очередь, это вызывает повышающую регуляцию экспрессии TREM-1, приводя к порочному циклу, усиливающему воспаление (см. Bouchon и др., J. Immunol., 164, 2000, с. 4991-4995). Все возрастающее количество данных свидетельствует о том, что TLR вносят вклад в возникновение и прогрессирование хронических воспалительных заболеваний, таких как РА и IBD.

Гуманизированные МАт к TREM-1, которые ингибируют функцию TREM-1 как человека, так и обезьян циномогус, описаны в различных документах (см. WO 2013/120553 A1 и WO 2016/009086 A1). Однако указанные антитела либо обладают профилем вязкости, затрудняющим процесс производства, либо приводят к другим проблемам, которые могут ограничивать их терапевтический потенциал (таким, например, как цитокиновый шторм и ADCC) (см. Shire и др., J. Pharm. Sci., 93, 2004, с. 1390-1402; и Warncke и др., J. Immunol., 188, 2012, с. 4405-4411). Следовательно, существует необходимость в антителах к TREM-1, которые могут специфически связываться с TREM-1 и ингибировать его функцию, но не приводят к проблемам, характерным для созданных ранее антител к TREM-1.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении представлены выделенные антитела, такие как моноклональные антитела, прежде всего человеческие (например, моноклональные) антитела, которые специфически связываются с триггерным рецептором-1, экспрессируемым на миелоидных клетках (TREM-1), и обладают требуемыми функциональными свойствами. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), переменную область легкой цепи (VL) и константную область тяжелой цепи IgG1, где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с константной областью тяжелой цепи IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело перекрестно конкурирует с mAb 0318 за связывание с TREM-1, блокируя его, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), переменную область легкой цепи (VL) и константную область тяжелой цепи IgG1, где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с константной областью тяжелой цепи IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с тем же самым эпитопом TREM-1, что и mAb 0318. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело специфически связывается с эпитопом TREM-1, содержащим один или несколько аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44, L45, E46, K47, F48, A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, Y90, H91, D92, H93, G94, L95 и L96 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело специфически связывается с эпитопом TREM-1, содержащим аминокислоты с D38 по L45, с E46 по Q56 и/или с Y90 по L96 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область тяжелой цепи IgG1, представленного в настоящем описании антитела, содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, L234A, L235E, G237A, D356E и L358M (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, D356E и L358M (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, C226S, C229S (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR3 тяжелой цепи содержит DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) или DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) за исключением одной или двух замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR3 тяжелой цепи содержит DQGIRRQFAY (SEQ ID NO: 72).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR2 тяжелой цепи содержит RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) или RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) за исключением одной или двух замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит TYAMH (SEQ ID NO: 24) или TYAMH (SEQ ID NO: 24) за исключением одной или двух замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 легкой цепи содержит RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27) или RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27) за исключением одной или двух замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR2 легкой цепи содержит RASNLES (SEQ ID NO: 28) или RASNLES (SEQ ID NO: 28) за исключением одной или двух замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения CDR3 легкой цепи содержит QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) или QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) за исключением одной или двух замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения VH антитела, представленного в настоящем описании, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% и примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения VL антитела, представленного в настоящем описании, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH и VL содержат SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления изобретения легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

В настоящем изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее

CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;

CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и

константную область тяжелой цепи IgG1,

где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,

где CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и

где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E и G237A (EU-нумерация).

В настоящем изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее

CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;

CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и

константную область тяжелой цепи IgG1,

где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,

где CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и

где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E, G237A, A330S и P331S (EU-нумерация).

В настоящем изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с

TREM-1, содержащее

CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;

CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и

константную область тяжелой цепи IgG1,

где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,

где CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и

где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация).

В настоящем изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее

CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;

CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и

константную область тяжелой цепи IgG1,

где CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,

где CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и

где константная область тяжелой цепи IgG1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация).

В некоторых вариантах осуществления изобретения TREM-1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, обладает более низкой аффинностью связывания с FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b) или с любой их комбинацией по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело обладает аффинностью связывания с FcγRI (CD64), более низкой по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в шесть раз, по меньшей мере в семь раз, по меньшей мере в восемь раз, по меньшей мере в девять раз или по меньшей мере в 10 раз по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, является менее иммуногенным по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело не обладает агонистическим действием в отношении передачи сигнала TREM-1 после связывания с TREM-1 и в отсутствие стимулятора. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело не индуцирует экспрессию провоспалительного цитокина в незрелых дендритных клетках (iDC) при инкубации клеток в присутствии антитела и в отсутствие стимулятора по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, блокирует производство провоспалительного цитокина в клетке при активации клеток в присутствии, как антитела, так и стимулятора. В некоторых вариантах осуществления изобретения стимулятор представляет собой лиганд для TREM-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения провоспалительный цитокин выбирают из группы, состоящей из IL-6, TNF-α, IL-8, IL-1β, IL-12, хитиназа-3-подобного белка 1 (CHI3L1) и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем описании, связывается с человеческим FcRn, FcRn обезьян циномоглус и/или мышинным FcRn в зависимости от pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, обладает более высокой термостабильностью по сравнению с референс-антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54, по дан-

ным измерений с помощью капиллярного дифференциального сканирующего калориметра (CAP-DSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения при нагреве до 77°C состояние примерно от 10 до 20%, примерно от 20 до 30% (например, 24%) или примерно от 30 до 40% антител является обратимым. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет более высокую температуру плавления (T_m) по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, имеет вязкость менее чем 5 сП, менее чем 4 сП, менее чем 3 сП, менее чем 2,5 сП, менее чем 2,4 сП, менее чем 2,3 сП, менее чем 2,2 сП, менее чем 2,1 сП, менее чем 2 сП, менее чем 1,9 сП, менее чем 1,8 сП, менее чем 1,7 сП, менее чем 1,6 сП, менее чем 1,5 сП, менее чем 1,4 сП, менее чем 1,3 сП, менее чем 1,2 сП, менее чем 1,1 сП, менее чем 1,0 сП, менее чем 0,9 сП, менее чем 0,8 сП, менее чем 0,7 сП, менее чем 0,6 сП, менее чем 0,5 сП, менее чем 0,4 сП, менее чем 0,3 сП, менее чем 0,2 сП или менее чем 0,1 сП при концентрации 80 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет вязкость менее чем 10 сП (например, 9 сП) при концентрации 130 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела с человеческим TREM-1 характеризуется величиной K_D , составляющей менее чем 4 нМ (например, 3,4 нМ), по данным измерений методом Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела с TREM-1 обезьян циномоглус характеризуется величиной K_D , составляющей менее чем 1 нМ (например, 0,91 нМ), по данным измерений методом Вiasoge.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является мономерным по данным анализа методом гель-фильтрации-жидкостной хроматографии высокого разрешения (ГФ-ЖХВР). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело характеризуется минимальным риском фрагментации по данным анализа с помощью двумерной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (2D-ЖХ/МС) или анализа массы интактных белков с помощью жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/МС). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет изоэлектрическую точку от 8 до 9 (например, 8,75).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело обладает стабильностью в составе композиции, содержащей гистидин, сахарозу, аргинин и NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело сохраняет стабильность в течение по меньшей мере 2 месяцев в составе композиции, содержащей 20 мМ гистидин, 150 мМ сахарозу, 25 мМ аргинин и 50 мМ NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция имеет pH 6,0 и/или композицию хранят при 4, 25 или 40°C.

В настоящем описании предложены также биспецифические молекулы, содержащие антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, которое сцеплено с молекулой, обладающей второй специфичностью связывания.

В настоящем описании предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, представленное в настоящем описании, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки, трансформированные векторами.

В настоящем описании предложены иммуноконъюгаты, содержащие антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, которые сцеплены с агентом.

В настоящем описании предложены композиции, содержащие антитела к TREM-1 или их антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические молекулы или иммуноконъюгаты, представленные в настоящем описании, и носитель. В настоящем описании предложены также наборы, содержащие антитела к TREM-1 или их антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические молекулы или иммуноконъюгаты, представленные в настоящем описании, и инструкции по их применению.

В настоящем описании предложен способ ингибирования активности TREM-1 у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение антитела к TREM-1, биспецифической молекулы, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или иммуноконъюгата, указанных в настоящем описании.

В настоящем описании предложен способ лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение антитела к TREM-1, биспецифической молекулы, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или иммуноконъюгата, указанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона (CD), неспецифического язвенного колита (UC), синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита (RA), псориаза, псориатического артрита, системной красной волчанки (SLE), волчаночного нефрита, васкулита, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), диабета типа I, болезни Грейвса, рассеянного склероза (MS), аутоиммунного миокардита, болезни Кавасаки, заболевания коронарной артерии, хронического обструктивного заболевания легких, интерстициального заболевания легких, аутоиммунного тиреоидита, склеродермы, системного склероза, остеоартрита, атопического дерматита, витилиго, реакции «трансплантат-против хозяина», синдрома Шегрена, аутоиммунного нефрита, синдрома Гудпасчера, хронической воспалительной демиелинизирующей полинеuropатии, аллергии, астмы, других аутоиммунных заболеваний, которые являются результатом

либо остро, либо хронического воспаления, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает также введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к IP-10 или антитело к TNF- α .

Краткое описание чертежей/фигур

На фигурах показано следующее.

На фиг. 1А и 1Б представлены данные, демонстрирующие, что все варианты mAb 0318 связываются с TREM-1 человека и обезьян циномоглус с аффинностью, сходной с аффинностью исходного антитела mAb 0318 (IgG4). На фиг. 1А представлены данные о аффинности связывания варианта 318-IgG1.3f с TREM-1 человека (верхний ряд) и обезьян циномоглус (нижний ряд). На фиг. 1Б представлены данные об аффинности связывания нескольких различных вариантов mAb 0318 с человеческим TREM-1. Различные представленные варианты включают (I) 318-IgG1.1f, (II) 318-IgG1.3f, (III) 318-IgG4-Aba, (IV) 318-IgG1-Aba и (V) 318-IgG1.1f (мутанты с заменой М на Q). На фиг. 1Б для целей сравнения представлены данные об аффинности связывания антитела mAb 0318 (варианты IgG4 А и В).

На фиг. 2А и 2Б представлены данные об интернализации mAb 0318-IgG1.3f после связывания с TREM-1, экспрессируемым на CD14⁺-моноцитах, в различные моменты времени после связывания с TREM-1. На фиг. 2А - результаты анализа экспрессии рецептора TREM-1 через 0, 6 и 24 ч после связывания. На фиг. 2Б - результаты анализа экспрессии рецептора TREM-1 через 0, 4 и 20 ч после связывания. На фиг. 2Б представлены также данные, полученные с использованием антитела TREM26, которое не конкурирует с вариантами антитела 0318 за связывание с TREM-1. Антитело TREM26 применяли для оценки "судьбы" рецептора TREM-1 после его интернализации (например, подвергается ли он деградации или возвращается назад на поверхность).

На фиг. 3 - демонстрация того, что варианты mAb 0318 не оказывают агонистического воздействия на передачу сигнала TREM-1 по данным репортерного клеточного анализа BWZ/hTREM-1, в котором репортерную линию клеток инкубировали вместе ("обе") или без CHO-CD32 ("только BWZ 36"). Представленные варианты антител включали (I) 318-IgG1.1f ("IgG1.1f"), (II) 318-IgG1.3f ("gG1.3f"), (III) 318-IgG4-Aba ("FcAba-4"), (IV) 318-IgG1-Aba ("FcAba-1"). Антитело MAB 1278, являющееся известным агонистом передачи сигнала TREM-1, применяли в качестве антитела, служащего положительным контролем (см. вставку, выделенную рамкой). Антитело 5C8 (контроль изотипа) применяли в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 4 представлены данные об эффективности различных вариантов mAb 0318 в отношении блокирования опосредуемого TREM-1 производства провоспалительных цитокинов различными человеческими клетками. Варианты антитела mAb 0318, представленные на фиг. 4, ингибировали опосредуемое TREM-1 высвобождение провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-6 или IL-8) из различных типов человеческих клеток: PBMC, моноцитов, нейтрофилов и цельной крови после седиментации RBC (а именно большинство эритроцитов удаляли согласно протоколу осаждения RBC с использованием декстрана согласно процедуре, описанной в примерах). Для производства провоспалительных цитокинов клетки стимулировали либо иммобилизованным на планшете PGRP1 и растворимым пептидогликаном, не обладающим TLR2-активностью ("PGRP+PGN-Ecndss"), либо стимулированными форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) нейтрофилами, экспрессирующими PGRP1 ("PMA-Stim Neutrophil Endogenous PGRP" (эндогенный PGRP стимулированных PMA нейтрофилов)). Представленные варианты антител включали (I) 0318-IgG4, (II) 0318-IgG1.3f, (III) 0318-IgG1.1f, (IV) 0318-IgG1-Aba и (V) 318-IgG4-Aba. "N/D" обозначает, что уровень экспрессии конкретного провоспалительного цитокина не определяли.

На фиг. 5А и 5Б представлены данные об эффективности mAb 0318-IgG1.3f в отношении блокады производства IL-8 в цельной крови после стимуляции PGN с применением или без применения PGRP1 в присутствии ингибитора NOD2. На фиг. 5А представлены данные об ингибировании, полученные с помощью фармакодинамического анализа цельной крови согласно методу, описанному в примерах. На фиг. 5Б представлены данные об ингибировании, полученные с помощью внутриклеточного анализа цитокинов в цельной крови согласно методу, описанному в примерах.

На фиг. 6А-6В показаны уровни экспрессии РНК хитиназа-3-подобного белка 1 ("CHI3L1") (фиг. 6А), IL-1 β (фиг. 6Б) и IL-6 (фиг. 6В) в цельной крови, стимулированной в присутствии mAb 0318-IgG1.3f в различных концентрациях (0-1 нМ). Цельную кровь брали у трех различных доноров (№ 126, 290 и 322) и стимулировали растворимым PGRP1 и растворимым пептидогликаном, не обладающим активностью в отношении TLR2 ("растворимый PGRP+ растворимый PGN-Ecndss"). На каждой из фиг. 6А-6В представлены уровни экспрессии РНК (у-ось) как в виде % ингибирования (правая колонка), так и в виде $\Delta\Delta Ct$ (разница между уровнем референс-гена и уровнем гена в тестируемом образце) (левая колонка). На х-оси приведены различные концентрации антитела 0318-IgG1.3f.

На фиг. 7 показан профиль вязкость-концентрация двух вариантов антитела 318-IgG1.1f (квадраты) и 318-IgG1.3f (кружки). Определение профиля вязкости осуществляли на основе схемы разведения с помощью динамического вискозиметра Rheosense m-VROC с использованием 3-точечной развертки сдвигового усилия для каждой точки при постоянной температуре. Сплошная линия представляет собой кри-

вую, полученную путем нелинейной аппроксимации данных методом наилучшего подбора. Пунктирной линией обозначен максимально допустимый с точки зрения эффективности уровень вязкости.

На фиг. 8 представлены данные, демонстрирующие, что оба варианта антитела 318-IgG1.1f и 318-IgG1.3f характеризовались риском иммуногенности от низкого до умеренного. В качестве положительных контролей применяли VL6 (иммуногенное IL-21R mAb) и KLH (гемоцианин лимфы улитки). В качестве отрицательного контроля применяли авастин.

На фиг. 9А и 9Б представлены данные, демонстрирующие, что все варианты mAb 0318 обладают способностью связываться с FcRn (человека (черный цвет), обезьян циномоглус (белый цвет) и мышей (серый цвет)) в зависимости от pH. На фиг. 9А представлены данные о связывании с FcRn в виде % Rmax (максимальная способность связываться с FcRn). На фиг. 9Б представлены данные о связывании с FcRn в виде сенсограмм. Представленные варианты антитела 0318 включают (I) IgG1-Aba, (II) IgG4-Aba, (III) IgG1.1f и (IV) IgG1.3f. Для целей сравнения представлены также данные для антитела mAb 0318 (IgG4).

На фиг. 10А и 10Б представлены данные, демонстрирующие, что все варианты антитела mAb 0318 характеризуются пониженной способностью связываться с одним или несколькими человеческими FcγR (а именно CD64, вариант CD32a-H131, вариант CD32a-R131, CD32b, вариант CD16a-V158 и вариант CD16B-NA2). На фиг. 10А представлены данные об аффинности связывания в виде % Rmax (максимальная способность связываться с FcγR). На фиг. 10Б представлены сенсограммы. Представленные варианты антитела 0318 включают (I) IgG1-Aba, (II) IgG4-Aba, (III) IgG1.1f и (IV) IgG1.3f. Для целей сравнения представлены данные для антитела mAb 0318 (IgG4). В качестве контроля применяли антитело IF4-hIgG1, в отношении которого известно, что оно связывается с несколькими FcγR.

На фиг. 11А-11И представлены данные, демонстрирующие, что варианты антитела 0318 сами по себе (т.е. в отсутствии стимула) не являются агонистическими, о чем свидетельствуют результаты измерений высвобождения различных провоспалительных цитокинов (например, IL-6, TNF-α и IL-12) при культивировании с незрелыми дендритными клетками. На фиг. 11А, 11Б и 11В представлены количества IL-6, продуцированного незрелыми дендритными клетками, выделенными из доноров D179, D276 и D341 соответственно. На фиг. 11Г, 11Д и 11Е представлены количества TNF-α, продуцированного незрелыми дендритными клетками, выделенными из доноров D179, D276 и D341 соответственно. На фиг. 11Ж, 11З и 11И представлены количества IL-12, продуцированного незрелыми дендритными клетками, выделенными из доноров D179, D276 и D341 соответственно. Представленные варианты антитела 0318 включают (I) IgG1.1f, (II) IgG1.3f и (III) IgG1-Aba. В скобках указаны дозы (мкг/мл) антител. Незрелые дендритные клетки культивировали с вариантами антитела к TREM-1 в присутствии и в отсутствии клеток СНО, экспрессирующих на мембране CD32a (для стимуляции перекрестного связывания Fc). PGRP+PGN, тример CD40L ("Trimer") и агонистическое антитело к CD40 фирмы Pfizer ("CP870") применяли в качестве положительных контролей. В качестве отрицательного контроля применяли изотипическое антитело ("CHIL-6"). Пунктирной линией показан нижний предел обнаружения анализа.

На фиг. 12 - фармакокинетические характеристики варианта mAb 0318-IgG1.3f в организме обезьяны циномоглус после подкожного введения однократной дозы. Каждому животному вводили одну из следующих доз: (I) 0,1 мг/кг (n=4) ("1"), (II) 0,5 мг/кг (n=4) ("2"), (III) 2 мг/кг (n=3) ("3") или (IV) 10 мг/кг (n=4) ("4"). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения.

На фиг. 13 показана схема мишень-опосредованного распределения лекарственного средства (TMDD), используемая для описания данных о фармакокинетике (ФК), фармакодинамике (ФД) и оккупации рецептора (RO) у обезьян циномоглус.

На фиг. 14А и 14Б показана общая плотность рецепторов TREM-1 на моноцитах (фиг. 14А) и гранулоцитах (фиг. 14Б) после введения обезьянам (подкожно (sc) или внутривенно (iv)) однократной дозы варианта mAb 0318-IgG1.3f циномоглус. Плотность рецепторов TREM-1 представлена в виде процента от плотности рецепторов TREM-1 до введения антитела. Каждому из животных вводили одну из следующих доз: (а) 0,1 мг/кг (sc) (n=4) ("А"), (б) 0,5 мг/кг (sc) (n=4) ("Б"), (в) 2 мг/кг (sc) (n=3) ("В"), (г) 2 мг/кг (iv) (n=3) ("Г") или (е) 10 мг/кг (sc) (n=4) ("Д"). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения.

На фиг. 15А и 15Б представлены данные об оккупации рецептора TREM-1 на моноцитах (фиг. 15А) и гранулоцитах (фиг. 15Б) после введения обезьянам циномоглус однократной дозы варианта mAb 0318-IgG1.3f. Данные об оккупации рецептора представлены в виде процента от общего количества экспрессированных на клетках рецепторов TREM-1. Каждому животному вводили одну из следующих доз: (а) 0,1 мг/кг (sc) (n=4) ("А"), (б) 0,5 мг/кг (sc) (n=4) ("Б"), (в) 2 мг/кг (sc) (n=3) ("В"), (г) 2 мг/кг (iv) (n=3) ("Г") или (д) 10 мг/кг (sc) (n=4) ("Д"). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения. Пунктирная линия соответствует 85%-ной оккупации рецептора.

На фиг. 16А и 16Б показаны полученные экспериментально (незакрашенные кружки) и предсказанные на основе модели (сплошная линия) результаты оценки ФК (верхняя левая панель), ФД (верхняя правая панель), RO (нижняя левая панель) и общего уровня экспрессии на поверхности рецептора TREM-1 (нижняя правая панель) после введения однократной дозы варианта mAb 0318-IgG1.3f обезьянам циномоглус, при этом для теоретической оценки применяли 2-компарментную модель ФК с TMDD

в центральном компартменте. На фиг. 16А представлены данные, полученные при подкожном введении каждой обезьяне однократной дозы антитела, составляющей 0,1 мг/кг. На фиг. 16Б представлены данные, полученные при подкожном введении животным однократной дозы антитела, составляющей 10 мг/кг.

Подробное описание изобретения

Для облегчения понимания настоящего описания сначала даны определения некоторых понятий. Дополнительные определения приведены в тексте подробного описания.

Следует понимать, что употребление элемента в единственном числе подразумевает его применение и во множественном числе; например, следует понимать, что понятие "нуклеотидная последовательность" обозначает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Таким образом, понятия "один" (или "несколько"), "один или большее количество" и "по меньшей мере один" можно использовать взаимозаменяемо в контексте настоящего описания.

Кроме того, следует понимать, что в контексте настоящего описания "и/или" относится конкретно к каждой/каждому из двух указанных характеристик или компонентов в сочетании друг с другом или по отдельности.

Так, следует иметь в виду, что понятие "и/или", используемое в таком выражении как "А и/или В" в контексте настоящего описания включает "А и В", "А или В", "А" (индивидуально) и "В" (индивидуально). Аналогично этому, следует иметь в виду, что понятие "и/или", используемое в таком выражении как "А, Б и/или В" включает следующие варианты: А, Б и В; А, Б или В; А или В; А или Б; Б или В; А и В; А и Б; Б и В; А (индивидуально); Б (индивидуально) и В (индивидуально).

Следует понимать, что если в отношении каких-либо аспектов в настоящем описании употребляется выражение "содержащий", то оно включает также аналогичные аспекты, описанные иным образом с помощью понятий "состоящий из" и/или "практически состоящий из".

Если не указано иное, то все технические и научные понятия, используемые в настоящем описании, имеют значение, известное обычному специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2-е изд., изд-во CRC Press, 2002; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3-е изд., изд-во Academic Press, 1999; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, дополненное издание, изд-во Oxford University Press, 2000 представляют широко известные собой словари, в которых специалист в данной области может найти многие из понятий, используемых в настоящем описании.

Единицы, префиксы и символы применяют в форме, соответствующей Международной системе единиц (СИ). Численные диапазоны включают числа, определяющие границы диапазона. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности написаны слева направо в 5'→3'-ориентации. Аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу. Заголовки, приведенные в настоящем описании, не ограничивают объем различных объектов изобретения, который определяется всей заявкой в целом. Соответственно понятия, определенные непосредственно ниже в тексте, более полно определяются всей заявкой в целом.

Понятие "примерно" в контексте настоящего описания означает "приблизительно", "грубо", "около этого" или "в области этого". Когда понятие "примерно" используют применительно к числовому диапазону, то оно модифицирует указанный диапазон путем расширения границ выше и нижеуказанных численных значений. В целом понятие "примерно" может модифицировать численное значение в сторону увеличения и уменьшения указанного значения на разницу, составляющую, например, 10%, вверх или вниз (делая его выше ли ниже).

Понятие "триггерный рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках" (известный также как TREM1, TREM-1 и CD354), относится к рецептору, который экспрессируется на моноцитах, макрофагах и нейтрофилах. Основным лигандом для TREM-1 является пептидогликан-распознающий белок 1 (PGLYRP1), который относится к семейству пептидогликан (PGN)-связывающих белков (PGRP). После активации TREM-1 вступает в ассоциацию с ITAM-содержащим сигнальным адапторным белком, DAP12. Передача сигнала в прямом направлении может включать активацию фактора транскрипции NFAT, вызывая повышающую регуляцию производства провоспалительных цитокинов. Понятие "TREM-1" включает любые варианты или изоформы TREM-1, которые в естественных условиях экспрессируются клетками. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, представленные в настоящем описании, могут перекрестно взаимодействовать с TREM-1 из видов, отличных от человека (например, с TREM-1 обезьян циномоглус).

Идентифицированы три изоформы TREM-1. Изоформа 1 (регистрационный номер NP_061113.1; SEQ ID NO: 1) состоит из 234 аминокислот и представляет собой каноническую последовательность. Изоформа 2 (регистрационный номер NP_001229518.1; SEQ ID NO: 2) состоит из 225 аминокислот и отличается от канонической последовательности аминокислотными остатками 201-234. Аминокислотные остатки кодируют часть трансмембранного домена и цитоплазматический домен. Изоформа 3 (регистрационный номер NP_001229519; SEQ ID NO: 3) состоит из 150 аминокислот и является растворимой. В ней отсутствуют аминокислотные остатки 151-234, которые кодируют трансмембранный домен, цитоплазматический домен и часть внеклеточного домена. Аминокислотные остатки 138-150 также отличаются от описанной выше канонической последовательности.

Ниже представлены аминокислотные последовательности трех известных изоформ человеческого TREM-1.

(А) Изоформа 1 человеческого TREM-1 (регистрационный номер NP_061113.1; SEQ ID NO: 1; кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей регистрационный номер NM_018643; SEQ ID NO: 4):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLEKFASSQ
 KAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMVNLQVE
 DSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKA
 LCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTVTDIIRVPVFNIVILLAGGFLSKS
 LVFSVLFVAVTLRSFVP

(сигнальная последовательность подчеркнута);

(Б) Изоформа 2 человеческого TREM-1 (регистрационный номер NP_001229518.1; SEQ ID NO: 2; кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей регистрационный номер NM_001242589; SEQ ID NO: 5):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLEKFASSQ
 KAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMVNLQVE
 DSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKA
 LCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTVTDIIRYSFQVPGPLVWTLSPFL
 PSLCAERM

(сигнальная последовательность подчеркнута);

(В) Изоформа 3 человеческого TREM-1 (регистрационный номер NP_001229519; SEQ ID NO: 3; кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей регистрационный номер NM_001242590; SEQ ID NO: 6):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLEKFASSQ
 KAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMVNLQVE
 DSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFRCSLTSFVSWLVDS

(сигнальная последовательность подчеркнута).

Предсказано, что белок TREM-1 обезьян циномоглус (регистрационный номер XP_001082517; SEQ ID NO: 7) должен иметь следующую аминокислотную последовательность:

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATTELTEEKYEYKEGQTLVKCDYALEKYANSR
 KAWQKMEGKMPKILAKTERPSENSHPVQVGRITLEDYPDHGLLQVQMTNLQVE
 DSGLYQCVIYQHPKESHVLFNPICLVVTKGSSGTPGSSENSTQNVYRTPSTTAKA
 LGPRYTSVRTVTQAPPESTVVVSTPGSEINLTVTDIIRVPVFNIVIVVAGGFLSKS
 LVFSVLFVAVTLRSFGP

(сигнальная последовательность подчеркнута).

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются и блокируют функцию TREM-1. Антитела блокируют функцию TREM-1 путем снижения/блокады активации TREM-1 и передачи сигнала в прямом направлении.

Антитела к TREM-1, предлагаемые в настоящем описании, блокируют передачу сигнала TREM-1 посредством одного или комбинации нескольких различных механизмов, блокируя TREM-1 непосредственно или косвенно. В одном из вариантов осуществления изобретения антитела препятствуют естественному лиганду для TREM-1, пептидогликан-распознающему белку 1 (PGLYRP1), создавать функциональный комплекс с TREM-1. В другом варианте осуществления изобретения антитела блокируют TREM-1, препятствуя индивидуальным молекулам TREM-1 формировать димеры или мультимеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижение или предупреждение димеризации или мультимеризации TREM-1 обусловлено антителами к TREM-1, обладающими способностью связываться с частью TREM-1, которая в противном случае находилась бы на поверхности раздела в димере TREM-1, предупреждая тем самым ассоциацию индивидуальных молекул TREM-1 друг с другом. В других вариантах осуществления изобретения снижение или предупреждение димеризации или мультимеризации TREM-1 обусловлено антителами к TREM-1, которые препятствуют взаимодействию TREM-1 с его лигандом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 могут блокировать индуцируемую PGLYRP1 активацию TREM-1. PGLYRP1, представляющий собой высококонсервативный содержащий 196 аминокислот белок, который состоит из сигнального пептида и пептидогликан-связывающего домена, экспрессируется на нейтрофилах и высвобождается после их активации. Ниже представлена аминокислотная последовательность PGLYRP1 (регистрационный номер NP_005082.1; SEQ ID NO: 8):

MSRRSMLLAWALPSLLRLGAAQETEDPACCSPIVPRNEWKALASECAQHLSLPL
 RYVVVSHTAGSSCNTPASCQQQARNVQHYNMKTLGWCDVGYNFLIGEDGLVY
 EGRGWNFTGAHSGHLWNPMSIGISFMGNYMDRVPTPQAIRAAQGLLACGVAQ
 GALRSNYVLKGHRDVQRTLSPGNQLYHLIQNWPHYRSP

(сигнальная последовательность подчеркнута).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем изобретении, осуществляют понижающую регуляцию или блокируют высвобождение провоспалительных цитокинов из миелоидных клеток (например, дендритных клеток и моноцитов). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 блокируют высвобождение TNF- α , MIP-1-бета, MCP-1, IL-1-бета, GM-CSF, IL-6 и/или IL-8 из макрофагов, нейтрофилов, клеток синовиальной ткани и/или репортерной клетки, что продемонстрировано в настоящем описании.

Хотя контролируемое высвобождение провоспалительных цитокинов в ответ на чужие антигены может быть благоприятным (например, вызывать эффективный адаптивный иммунный ответ), избыточное высвобождение провоспалительных цитокинов может иметь тяжелые последствия. Например, одним из общих и токсических осложнений, которые наблюдались при введении *in vivo* определенных антител против иммунных рецепторов на поверхности иммунных клеток (например, антител к человеческому CD3, таких как OKT3), является синдром высвобождения цитокинов (CRS), который ассоциирован с избыточным высвобождением различных цитокинов (например, TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2) в кровотоке. CRS может возникать в результате одновременного связывания антител с их когнатым антигеном (например, CD3 на Т-клетках) (посредством вариативной области антитела) и Fc-рецепторами (например, Fc γ R) и/или рецепторами комплемента (посредством константной области антитела) на вспомогательных клетках (например, на антигенпрезентирующих клетках). Такое взаимодействие приводит к активации клеток (например, Т-клеток и/или вспомогательных клеток) и высвобождению различных цитокинов, которые вызывают системный воспалительный ответ, характеризующийся гипотензией, гипотермией и ознобом. Другие симптомы CRS включают лихорадку, озноб, тошноту, рвоту и одышку.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, помимо блокады индуцированного PGLYRP1 производства провоспалительных цитокинов приводят к снижению количества случаев или к устранению случаев возникновения синдрома высвобождения цитокинов после введения индивидууму, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 не индуцируют экспрессию провоспалительных цитокинов клетками (например, дендритными клетками), когда клетки инкубируют в присутствии только антитела, по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 обладают пониженной способностью связываться с одним или несколькими Fc γ R, что способствует снижению количества возникновения случаев CSR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, предлагаемые в настоящем изобретении, связываются с человеческим TREM-1, и с TREM-1 из других видов. Таким образом, в контексте настоящего описания понятие "TREM-1", включает любую встречающуюся в естественных условиях форму TREM-1, которая может иметь происхождение из любого пригодного организма. Например, TREM-1, пригодный для применения согласно настоящему описанию, может представлять собой TREM-1 позвоночного, такой как TREM-1 млекопитающего, такой как TREM-1 примата (такого как человек, шимпанзе, обезьяна циномогус или макак-резус); грызуна (такого как мышь или крыса), лагормфа (такого как кролик) или парнокопытного (такого как корова, овца, свинья или верблюд). В некоторых вариантах осуществления изобретения TREM-1 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1, изоформа 1). TREM-1 может представлять собой зрелую форму TREM-1, такую как белок TREM-1, который был подвергнут посттрансляционному процессингу в соответствующей клетке. Такой зрелый белок TREM-1 может, например, быть гликозилированным. TREM-1 может представлять собой полноразмерный белок TREM-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, предлагаемые в настоящем изобретении, представляют собой моноклональные антитела в том смысле, что они получены непосредственно или косвенным путем из одного клона В-лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 получают, подвергают скринингу и очищают с помощью методов, например, описанных в разделе "Примеры" публикации международной заявки на патент WO 2013/120553. В целом метод состоит в следующем: пригодную мышь, такую как мышь с "выключенным" (knock-out (KO)) TREM-1 или TREM-1/TREM-3, иммунизируют TREM-1, клеткой, экспрессирующей TREM-1 или их комбинацией. В другом варианте осуществления изобретения антитела к TREM-1 представляют собой поликлональные антитела в том смысле, что они являются смесью моноклональных антител, представленных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоя-

шем описании, рекомбинантно экспрессируются в прокариотических или эукариотических клетках. В некоторых вариантах осуществления изобретения прокариотическая клетка представляет собой *E.coli*. В конкретных вариантах осуществления изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку дрожжей, насекомого или млекопитающего, такую как клетка, полученная из организма, являющегося приматом (таким как человек, шимпанзе, обезьяна циномогус или макак-резус); грызуном (таким как мышь или крыса), лагоморфом (таким как кролик) или парнокопытным (таким как корова, овца, свинья или верблюд). Пригодными линиями клеток млекопитающих являются (но не ограничиваясь только ими) клетки HEK293, клетки CHO и клетки HELA. Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, можно получать также с помощью других методов, известных специалисту в данной области, таких как фаговый дисплей или дрожжевой дисплей. После получения антитела можно подвергать скринингу в отношении связывания, например, с полноразмерным TREM-1 или его мутантами с помощью методов, описанных в разделе "Примеры" публикации международной заявки на патент WO 2013/120553.

Понятие "антитело" в контексте настоящего описания относится к белку, полученному из последовательности зародышевой линии иммуноглобулина, который обладает способностью специфически связываться с антигеном (TREM-1) или его частью. Понятие включает полноразмерные антитела класса или подкласса (а именно IgA, IgE, IgG, IgM и/или IgY) и любые одноцепочечные антитела или фрагменты. Антитело, которое специфически связывается с антигеном или его частью, может связываться только с указанным антигеном или его частью или оно может связываться с ограниченным числом гомологичных антигенов или их частей. Полноразмерные антитела, как правило, содержат по меньшей мере четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, которые соединены друг с другом дисульфидными связями.

Одним из подклассов иммуноглобулинов, представляющих фармацевтический интерес, является семейство IgG. У человека класс IgG может быть подразделен на 4 подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 на основе последовательностей константных областей их тяжелых цепей. Легкие цепи могут быть подразделены на типы каппа и лямбда, на основе различий в составе их последовательностей. Молекулы IgG состоят из двух тяжелых цепей, сцепленных друг с другом двумя или большим количеством дисульфидных связей, и двух легких цепей, каждая из которых присоединена к тяжелой цепи дисульфидной связью. Тяжелая цепь может содержать переменную область тяжелой цепи (VH) и вплоть до трех константных областей тяжелой цепи (CH): CH1, CH2 и CH3. Легкая цепь может содержать переменную область легкой цепи (VL) константную область легкой цепи (CL). VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые гипервариабельными участками (определяющими комплементарность участками) (CDR), между которыми находятся более консервативные участки, называемые каркасными участками (FR). VH- и VL-области, как правило, состоят из трех CDR и четырех FR, которые располагаются в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Гипервариабельные участки тяжелой и легкой цепей формируют связывающий домен, который обладает способностью взаимодействовать с антигеном, в то время как константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая (но не ограничиваясь только ими) различные клетки иммунной системы (эффекторные клетки), Fc-рецепторы и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут находиться в выделенной форме. Понятие "выделенное антитело" относится к антителу, которое отделено и/или выделено из другого(их) компонента(ов) окружающей среды, в которой оно было получено, и/или очищено из смеси компонентов, присутствующих в окружающей среде, в которой оно было получено. В контексте настоящего изобретения можно рассматривать определенные антигенсвязывающие фрагменты антител, если продемонстрировано, что фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела.

Понятие "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или нескольким фрагменту(ам) антитела, который(е) сохраняют способность специфически связываться с антигеном, таким как TREM-1, представленным в настоящем описании. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab-, Fab'-, F(ab)₂-, F(ab')₂-, F(ab)S-, Fv- (как правило, VL- и VH-домены одного плеча антитела), одноцепочечный Fv- (scFv; см., например, Bird и др., *Science*, 242, 1988, с. 42S-426; Huston и др., *PNAS*, 85, 1988, с. 5879-5883), dsFv-, Fd- (как правило, VH- и CH1-домены) и dAb- (как правило, VH-домен) фрагменты; VH-, VL-, VhH- и V-NAR-домены; одновалентные молекулы, содержащие одну VH- и одну VL-цепь; миниантитела, диабоды, триабоды, тетрабоды и состоящие из каппа-цепи антитела (см., например, H11 и др., *Protein Eng.*, 10, 1997, с. 949-957); верблюжьих IgG; IgNAR; а также один или несколько выделенных CDR или функциональный паратоп, где выделенные CDR или антигенсвязывающие остатки или полипептиды могут быть ассоциированы или сцеплены друг с другом с образованием функционального фрагмента антитела. Различные типы фрагментов антител описаны или их обзор приведен, например, у Holliger и Hudson, *Nat. Biotechnol.*, 2S, 2005, с. 1126-1136; в публикации международной заявки на патент WO 2005/040219 и в публикациях патентов США 2005/0238646 и 2002/0161201. Указанные фрагменты антител можно получать с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты можно подвергать скринингу в отношении их пригодности таким же образом, что

и интактные антитела.

Понятие "человеческое" антитело (huMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых и каркасный участок, и CDR-участки имеют происхождение из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также имеет происхождение из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, интродуцированные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако в контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, имеющие происхождение из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, трансплантированы в последовательности человеческого каркасного участка. Понятия "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются как синонимы.

Понятие "гуманизированное" антитело относится к человеческому/нечеловеческому химерному антителу, которое содержит одну или несколько последовательностей (CDR-участков или их частей), имеющему происхождение из иммуноглобулина видов кроме человека. Так, гуманизированное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором по меньшей мере остатки из гипервариабельного участка реципиентного антитела заменены на остатки из гипервариабельного участка антитела вида кроме человека (донорское антитело), такого мыши, крысы, кролики или приматы кроме человека, которые обладают требуемой специфичностью, аффинностью, составом последовательности и функциональностью. В некоторых случаях остатки FR человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие нечеловеческие остатки. Примером такой модификации является интродукция одной или нескольких так называемых обратных мутаций, которые, как правило, представляют собой аминокислотные остатки, имеют происхождение из донорского антитела. Гуманизацию антитела можно осуществлять с помощью методов рекомбинации, известных специалисту в данной области (см., например, *Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology*, т. 248, под ред. Benny K. C. Lo). Пригодный человеческий реципиентный каркасный участок для вариабельного домена как легкой, так и тяжелой цепи, можно идентифицировать, например, на основе гомологии последовательности или структурной гомологии. Альтернативно этому можно использовать фиксированные реципиентные каркасные участки, например, на основе сведений о структуре, биофизических и биохимических свойств. Реципиентные каркасные участки могут иметь происхождение из зародышевой линии или из зрелой последовательности антитела. CDR-участки из донорского антитела можно переносить путем трансплантации CDR. Гуманизированное антитело с трансплантированным CDR можно подвергать дальнейшей оптимизации, например, в отношении аффинности, функциональности и биофизических свойств путем идентификации имеющих решающее значение положений в каркасном участке, повторная интродукция в которые (обратная мутация) аминокислотного остатка из донорского антитела оказывает благоприятное влияние на свойства гуманизированного антитела. Помимо применения полученных с использованием донорского антитела обратных мутаций гуманизированное антитело можно создавать путем интродукции остатков из зародышевой линии в CDR или каркасные участки, элиминации иммуногенных эпитопов, сайт-направленного мутагенеза, созревания аффинности и т.д.

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют в реципиентном антителе или в донорском антителе. Такие модификации осуществляют с целью дополнительного улучшения характеристик антитела. В целом гуманизированное антитело должно содержать по меньшей мере один, как правило, два вариабельных домена, в которых все или практически все CDR-участки соответствуют участкам нечеловеческого иммуноглобулина и в которых все или практически все остатки FR представляют собой остатки из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно может содержать также по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Понятие "производное гуманизированного антитела" относится к любой модифицированной форме гуманизированного антитела, такой как конъюгат, содержащий антитело и другой агент или другое антитело.

Понятие "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью методов рекомбинации, такие как

- (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина или получено из гибридомы;
- (б) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы;
- (в) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител; и
- (г) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других методов, в которых применяют сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, основанные на конкретных последовательностях иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, но включают последующие преобразования и мутации, возникающие, например, в процессе созревания антитела. Как известно в данной области (см., например, Lonberg, *Nature Biotech.*, 23(9), 2005, с. 1117-1125), переменные области содержат антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, который преобразуют с получением антитела, специфического в отношении чужого антигена. В дополнение к преобразованию переменную область можно дополнительно модифицировать с помощью нескольких одиночных аминокислотных замен (обозначаемых как соматическая мутация или гипермутация) для повышения аффинности антитела к чужому антигену. Константную область можно изменять для дополнительного ответа на антиген (т.е. путем переключения изотипа). Таким образом, молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина, подвергнутые преобразованию и соматической мутации для ответа на антиген, не могут обладать идентичностью последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, но они должны быть практически идентичными или сходными (т.е. идентичными по меньшей мере на 80%).

Понятие "химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области имеют происхождение из одного вида, а константные области имеют происхождение из другого вида, например, к антителу, в котором переменные области имеют происхождение из мышинового антитела, а константные области имеют происхождение из человеческого антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1, указанные в настоящем описании, представляют собой антитела в виде IgG. В контексте настоящего описания "антитело в виде IgG", например, человеческий IgG1, в некоторых вариантах осуществления изобретения имеет структуру встречающегося в естественных условиях антитела в виде IgG, т.е. оно имеет такое же количество тяжелых и легких цепей и дисульфидных связей, что и встречающееся в естественных условиях антитело в виде IgG того же подкласса.

Например, антитело к TREM-1 в виде IgG1 состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), где две тяжелые цепи и легкие цепи сцеплены с помощью такого же количества и таким же образом расположенных дисульфидных мостиков, что и во встречающемся в естественных условиях антителе в виде IgG1 (если только антитело не подвергнуто мутации с целью модификации дисульфидных мостиков).

В контексте настоящего описания понятие "изотип" относится к классу антител (например, антителу в виде IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Понятие "аллотип" относится к встречающимся в естественных условиях вариантам в конкретной изотипической группе, где варианты различаются несколькими аминокислотами (см., например, Jafferis и др., *mAbs* 1, 2009, с. 1). Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, могут относиться к любому аллотипу. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 имеют аллотип "IgG1.3f", который содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), по сравнению с изотипом IgG1 дикого типа (например, SEQ ID NO: 9). В других вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 имеют аллотип "IgG1.1f", который содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E, G237A, A330S и P331S (EU-нумерация), по сравнению с изотипом IgG1 дикого типа (например, SEQ ID NO: 9). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 имеют аллотип "IgG1-Aba", который содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация), по сравнению с изотипом IgG1 дикого типа (например, SEQ ID NO: 9). В других вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 имеют аллотип "IgG4-Aba", который содержит CH1-домен изотипа IgG4 дикого типа (например, SEQ ID NO: 10) и CH2- и CH3-домены IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело аллотипа IgG4-Aba содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация), по сравнению с изотипом IgG1 дикого типа (например, SEQ ID NO: 9).

Выражения "антитело, распознающее антиген" и "антитело, обладающее специфичностью в отношении антигена" используются в настоящем описании взаимозаменяемо с понятием "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "выделенное антитело" относится к антителу, которое отделено и/или выделено от/из другого(их) компонента(ов) в окружающей среде, в которой оно получено, и/или очищено из смеси компонентов, присутствующих в окружающей среде, в которой оно получено.

Понятие "эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом, или к биохимическому событию, произошедшему в результате этого. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC, и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и понижающую регуляцию рецептора клеточной поверх-

ности (например, В-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции, как правило, требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, с переменным доменом антитела). В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, содержат Fc-области, которые не связываются с одним или несколькими FcγR и следовательно не обладают эффекторной функцией (т.е. не являются эффекторами).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом в виде IgG, включают рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и образовавшиеся в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIa, FcγRIIa и FcγRIIIa у человека) рецепторов и одного ингибирующего (FcγRIb) рецептора. В данной области известны различные свойства человеческих FcγR. Большинство встречающихся в естественных условиях типов эффекторных клеток характеризуются совместной экспрессией одного или нескольких активирующих FcγR и ингибирующего FcγRIb, в то время как естественные клетки-киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIa у человека), но не ингибирующий FcγRIb у мышей и у человека. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и рассматривается в качестве эквивалента мышинному IgG2a касательно типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

Понятие "Fc-область" (область, представляющая собой кристаллизуемый фрагмент) или "Fc-домен", или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc-рецепторами, находящимися на различных клетках иммунной системы (например, на эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела за исключением первого домена константной области иммуноглобулина (например, CH1 или CL).

В IgG Fc-область содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между CH1- и CH2-доменами. Хотя определение границ Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина может варьироваться, в контексте настоящего описания Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG определяют как сегмент, простирающийся от аминокислотного остатка D221 в случае IgG1, V222 в случае IgG2, L221 в случае IgG3 и P224 в случае IgG4, до карбоксиконца тяжелой цепи (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). CH2-домен Fc-области человеческого IgG простирается от аминокислоты 237 до аминокислоты 340, а CH3-домен располагается на C-концевой стороне домена CH2 в Fc-области, т.е. он простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 или 446 (если отсутствует C-концевой остаток лизина), или 445 (если отсутствуют C-концевые остатки глицина и лизина) IgG. В контексте настоящего описания Fc-область может представлять собой имеющий нативную последовательность Fc, включая любые аллотипические варианты, или вариант Fc (например, не встречающаяся в естественных условиях Fc). Понятие "Fc" может относиться также к указанной области, рассматриваемой индивидуально, или в контексте содержащего Fc-полипептид белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", который называют также как "слитый с Fc белок" (например, антитело или иммуноадгезивный агент).

"Имеющая нативную последовательность Fc-область" или "имеющая нативную последовательность Fc" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности встречающейся в естественных условиях Fc-области. Имеющие нативную последовательность человеческие Fc-области включают

- имеющую нативную последовательность человеческого IgG1 Fc-область;
- имеющую нативную последовательность человеческого IgG2 Fc-область;
- имеющую нативную последовательность человеческого IgG3 Fc-область; и
- имеющую нативную последовательность человеческого IgG4 Fc-область, а также их встречающиеся в естественных условиях варианты.

Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis и др., mAbs 1, 2009, с. 1).

"Вариант последовательности Fc-области" или "не встречающаяся в естественных условиях Fc" содержит модификацию, как правило, служащую для изменения одного или нескольких функциональных свойств, таких как, сред прочего, время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором, стабильность белка и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность или ее отсутствие. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, могут быть модифицированы химически (например, к антителу могут быть присоединены один или несколько химических фрагментов) или могут быть модифицированы для изменения его гликозилирования, или для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1 представляет собой антитело изотипа IgG1 и несет модифицированный Fc-домен, содержащий одну или несколько и возможно все из следующих мутаций, которые приводят к пониженной аффинности к определенным Fc-рецепторам (L234A, L235E и G237A) и к пониженной C1q-опосредованной фиксации комплемента (A330S и P331S) соответ-

ственно (остатки пронумерованы согласно EU-индексу).

Понятия "шарнир", "шарнирный домен", "шарнирная область" и "шарнирная область антитела" относятся к домену константной области тяжелой цепи, которая соединяет CH1-домен с CH2-доменом и включает верхнюю, среднюю и нижнюю часть шарнира (Roux и др., *J. Immunol.*, 161, 1998, с. 4083). Шарнир обуславливает различные степени гибкости между связывающими и эффекторными областями антитела и обеспечивает также сайты для межмолекулярного дисульфидного связывания константных областей двух тяжелых цепей. В контексте настоящего описания шарнир начинается на Glu216 и заканчивается на Gly237 во всех изоформах IgG (Roux и др., *J. Immunol.*, 161, 1998, с. 4083). Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа известны в данной области (см., например, публикацию международной заявки на патент WO 2017/087678). В одном из вариантов осуществления изобретения шарнирную область CH1 антител к TREM-1 модифицируют таким образом, чтобы изменить, например, увеличить или уменьшить, количество цистеиновых остатков в шарнирной области. Такой подход более подробно описан, например, в US № 5677425.

Константную область можно модифицировать для стабилизации антитела, например, для снижения риска разделения двухвалентного антитела на два одновалентных VH-VL-фрагмента. Например, в константной области IgG4 остаток S228 (остатки пронумерованы согласно EU-индексу) можно подвергать мутации, заменяя его на остаток пролина (P), для стабилизации формирования дисульфидного мостика на шарнире между тяжелыми цепями (см., например, Angal и др., *Mol. Immunol.*, 30, 1995, с. 105-108). Антитела или их фрагменты можно оценивать также с позиций их определяющих комплементарность областей (CDR). Понятие "определяющая комплементарность область" или "гипервариабельная область" в контексте настоящего описания относится к областям антитела, в которых расположены аминокислотные остатки, участвующие в связывании с антигеном. Область гипервариабельности или CDR можно идентифицировать как области, характеризующиеся наибольшей вариабельностью, путем сравнительного анализа аминокислот вариабельных доменов антитела. Для идентификации CDR можно использовать базы данных, такие как база данных Кэбота, например, CDR определяют как участки, содержащие аминокислотные остатки 24-34 (CDR1), 50-59 (CDR2) и 89-97 (CDR3) вариабельного домена легкой цепи и 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) и 95-102 (CDR3) вариабельного домена тяжелой цепи (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91, 1991, с. 3242). Альтернативно этому CDR можно определять как участки, содержащие остатки из "гипервариабельной петли" (остатки 26-33 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196, 1987, с. 901-917). Как правило, нумерацию аминокислотных остатков в этой области осуществляют с помощью метода, описанного у Kabat и др., выше. Такие выражения, как "положение по Кэботу", "остаток по Кэботу" и "согласно Кэботу", в контексте настоящего описания относятся к указанной системе нумерации для вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи. При использовании системы нумерации Кэбота фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению или наличию инсерции в каркасном участке (FR) или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать аминокислотные инсерции (остатки 52a, 52b и 52c согласно Кэботу) после остатка 52 CDR H2 и встроенные путем инсерции остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Кэботу) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Номера остатков по Кэботу можно определять для рассматриваемого антитела путем сравнительного анализа областей гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной согласно Кэботу последовательностью.

Понятие "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, TREM-1), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело, что определяют, например, с помощью специфического метода, предназначенного для его идентификации. Эпитопы могут быть сформированы как непрерывно расположенными аминокислотами (как правило, в случае линейного эпитопа), так и не расположенными непрерывно аминокислотами, которые сближаются друг с другом в результате третичной укладки (фолдинга) белка (как правило, в случае конформационного эпитопа). Эпитопы, сформированные из непрерывно расположенных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, сформированные в результате третичного фолдинга, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот, находящихся в уникальной пространственной конформации. Методы определения того, какие эпитопы связываются с рассматриваемым антителом (т.е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области и включают, например, анализы методом иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых тестируют перекрывающиеся или непрерывные пептиды (например, из TREM-1) для оценки реактивности в отношении рассматриваемого антитела (например, антитела к TREM-1). Методы определения пространственной конформации эпитопов включают методы, известные в данной области, и методы, представленные в настоящем описании, например, рентгеновскую кристаллографию, мутационный анализ антигена, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, *Epitope Mapping Protocols*

in *Methods in Molecular Biology*, т. 66, под ред. G. E. Morris, 1996).

Понятие "связывается с тем же самым эпитопом" применительно к двум или большему количеству антител означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков по данным рассматриваемого метода. Методы определения того, связываются ли антитела с "тем же самым эпитопом на TREM-1", что и антитела, представленные в настоящем описании, включают, например, методы картирования эпитопа, такие как рентгенографический анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает разрешение эпитопа на уровне атомов, и масс-спектрометрический анализ обмена водород/дейтерий (HDX-MS). С помощью других методов осуществляют мониторинг связывания антитела с фрагментами антигена или мутантными вариантами антигена, где утрату способности к связыванию вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто рассматривают как показатель присутствия компонента эпитопа. Кроме того, для картирования эпитопа можно применять также вычислительные комбинаторные методы. Эти методы основаны на способности представляющего интерес антитела выделять на основе аффинности специфические короткие пептиды из комбинаторных фаговых дисплейных пептидных библиотек. Предполагается, что антитела, имеющие одни и те же последовательности VH и VL или одни и те же последовательности CDR1, 2 и 3, должны связываться с одним и тем же эпитопом.

Понятие "антитела, которые конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относится к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Вопрос о том, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли и в какой степени одно антитело связывание другого антитела с мишенью, можно решать с помощью известных экспериментов в условиях конкуренции, например, с помощью BIACORE®-анализа на основе метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело представляет собой "блокирующее антитело" (т.е. "холодное" антитело, которое первым инкубируют с мишенью). Анализы в условиях конкуренции можно проводить согласно методам, описанным, например, в *Cold Spring Harb Protoc*, под ред. Harlow и David Lane, 2006, DOI: 10.1101/pdb.prot4277; или в главе 11 "Using Antibodies", под ред. Harlow и David Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1999. Два антитела "перекрестно конкурируют друг с другом", если антитела взаимно блокируют друг друга по меньшей мере на 50%, т.е. безотносительно к тому, какое из двух антител первым приводят в контакт с антигеном при проведении анализа в условиях конкуренции.

В контексте настоящего описания понятия "специфическое связывание", избирательное связывание", "избирательно связывается" и "специфически связывается" относятся к связыванию антитела с эпитопом на заранее определенном антигене. Как правило, связывание антитела характеризуется

(I) константой равновесия реакции диссоциации (K_D), составляющей менее чем примерно 10^{-7} М, например, менее чем примерно 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже еще меньше, при ее определении, например, с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью устройства BIACORE® 2000 с использованием заранее определенного антигена, например, рекомбинантного человеческого TREM-1, в качестве анализата и антитела в качестве лиганда, или анализа связывания антитела с позитивными по антигену клетками по методу Скэтчарда; и

(II) аффинностью связывания с заранее определенным антигеном, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от заранее определенного антигена или близкородственного антигена.

Таким образом, антитело, которое "специфически связывается с человеческим TREM-1", представляет собой антитело, связывание которого с растворимым или связанным с клеткой человеческим TREM-1 характеризуется величиной K_D , составляющей 10^{-7} М или менее, например менее чем примерно 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже еще меньше. Антитело, которое "дает перекрестную реакцию с TREM-1 обезьян циномоглус", относится к антителу, связывание которого с TREM-1 обезьян циномоглус характеризуется величиной K_D , составляющей 10^{-7} М или менее, например менее чем примерно 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже еще меньше. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие антитела, которые не дают перекрестную реакцию с TREM-1 из видов кроме человека, характеризуются практически необнаруживаемым уровнем связывания с указанными белками по данным стандартного анализа связывания.

В контексте настоящего описания понятие "специфичность связывания" относится к взаимодействию молекулы, такой как антитело или его фрагмент, с одним единственным антигеном или с ограниченным количеством высокомолекулярных антигенов (или эпитопов). И наоборот, антитела, которые обладают способностью специфически связываться с TREM-1, не обладают способностью связываться с несходными с ним молекулами. Антитела, предлагаемые в изобретении, могут не обладать способностью связываться с Nkrp44, белком, родственным p44 естественных клеток-киллеров.

Специфичность взаимодействия и величину константы равновесия реакции связывания можно определять непосредственно с помощью хорошо известных методов. Стандартные анализы для оценки

способности лигандов (таких как антитела) связываться с их мишенями известны в данной области и включают, например, ELISA, вестерн-блоттинг, РИА и анализ методом проточной цитометрии. Кинетические характеристики связывания и аффинность связывания антитела также можно оценивать с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как SPR.

Анализы связывания в условиях конкуренции для определения того, конкурируют или перекрестно конкурируют ли два антитела за связывание, включают анализ конкуренции за связывание с миелоидными клетками, экспрессирующими TREM-1, например, с помощью метода проточной цитометрии, такого как описанный в разделе "Примеры". Другие методы включают SPR (например, BIACORE®), твердофазный прямой или косвенный радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или косвенный иммуоферментный анализ (ЕІА), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli и др., *Methods in Enzymology*, 9, 1983, с. 242); твердофазный прямой ЕІА с использованием взаимодействия биотин-авидин (см. Kirkland и др., *J. Immunol.*, 137, 1986, с. 3614); твердофазный прямой анализ с применением меченого соединения, твердофазный прямой сэндвич-анализ с применением меченого соединения (см. Harlow и Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Press, 1988); твердофазный прямой РІА с применением меченого соединения с использованием метки 1-125 (см. Morel и др., *Mol. Immunol.*, 25(1), 1988, с. 7); твердофазный прямой ЕІА с использованием взаимодействия биотин-авидин (Cheung и др., *Virology*, 176, 1990, с. 546); и прямой РІА с использованием меченого соединения (Moldenhauer и др., *Scand. J. Immunol.*, 32, 1990, с. 77).

В контексте настоящего описания понятие "группа" определено по отношению к референс-антителу. Если второе антитело не может связываться с антигеном одновременно с референс-антителом, то считается, что второе антитело входит в ту же самую "группу", что и референс-антитело. В этом случае референс-антитело и второе антитело связываются с одной и той же частью антигена и их обозначают как "конкурирующие антитела". Если второе антитело способно связываться с антигеном одновременно с референс-антителом, то считается, что второе антитело входит в другую "группу". В этом случае референс-антитело и второе антитело не конкурируют за связывание с одной и той же частью антигена и их обозначают как "неконкурирующие антитела".

Группировка антител не дает прямой информации об эпитопе. Для конкурирующих антител, т.е. антител, входящих в одну и ту же "группу", эпитопы могут представлять собой идентичные эпитопы, перекрывающиеся эпитопы или даже разные эпитопы. Последнее имеет место в том случае, когда референс-антитело, связанное со своим эпитопом на антигене, занимает пространство, которое требуется для того, чтобы второе антитело могло вступить в контакт со своим эпитопом на антигене ("стерическая помеха"). Неконкурирующие антитела, как правило, имеют различные эпитопы.

В контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к измерению силы нековалентного взаимодействия двух молекул, например, антитела или его фрагмента и антигена. Понятие "аффинность связывания" применяют для описания одновалентных взаимодействий (активности, внутренне присущей молекулам).

Аффинность связывания двух молекул, например, антитела или его фрагмента и антигена, обусловленную одновалентным взаимодействием, можно количественно оценивать путем определения константы равновесия реакции диссоциации (K_D). В свою очередь, K_D можно определять путем измерения кинетических характеристик процесса формирования и диссоциации комплекса, например, с помощью метода SPR. Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, обозначают как константа скорости реакции ассоциации k_a (или k_{on}) и константа скорости реакции диссоциации k_d (или k_{off}) соответственно. K_D связана с k_a и k_d уравнением $K_D = k_d/k_a$. В соответствии с указанным выше определением при сравнении аффинностей связывания различных антител с рассматриваемым антигеном аффинности связывания, ассоциированные с различными молекулярными взаимодействиями, можно сравнивать, например, путем сравнения величин K_D для индивидуальных комплексов антитело/антиген.

В контексте настоящего описания понятие "высокая аффинность" в отношении антигена-мишени для антитела в виде IgG относится к антителу, имеющему величину K_D , составляющую 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее или 10^{-10} М или менее. Однако "высокая аффинность" связывания может отличаться от указанного уровня для других изотипов антитела. Например, "высокая аффинность" связывания для изотипа IgM относится к антителу, имеющему величину K_D , составляющую 10^{-10} М или менее или 10^{-8} М или менее.

Понятие "EC₅₀" в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т.е. находится посередине между максимальным ответом и исходным уровнем.

В контексте настоящего описания понятие "встречающийся в естественных условиях", применяемое к объекту, отражает тот факт, что объект может присутствовать в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не модифицирована преднамеренно человеком в лаборатории, представляет собой встречающуюся в естественных условиях последовательность.

Понятие "полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно сцепленных аминокислотных остатка, при этом не существует ограничения на верхний предел длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как (но не ограничиваясь только ими) гликозилирование, фосфорилирование или формирование дисульфидной связи. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

В контексте настоящего описания понятие "молекула нуклеиновой кислоты" включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, и она может представлять собой кДНК.

"Консервативные аминокислотные замены" относятся к заменам аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В некоторых вариантах осуществления изобретения заранее определенный остаток заменимой аминокислоты в антигене к TREM-1 заменяют на другой аминокислотный остаток из того же самого семейства боковых цепей. Методы идентификации консервативных нуклеотидных и аминокислотных замен, которые не устраняют связывание с антигеном, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell и др., *Biochem.*, 32, 1993, с. 1180-1187; Kobayashi и др., *Protein Eng.*, 12(10), 1999, с. 879-884; и Burks и др., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 1997, с. 412-417).

Применительно к нуклеиновым кислотам понятие "существенная гомология" означает, что в двух нуклеиновых кислотах или обозначающих их последовательностях при оптимальном выравнивании и сравнении с учетом соответствующих инсерций или делеций нуклеотидов по меньшей мере примерно 80% нуклеотидов, по меньшей мере примерно от 90 до 95% или примерно от 98 до 99,5% нуклеотидов являются идентичными. Альтернативно этому существенная гомология имеет место в том случае, когда сегменты гибридизуются в условиях селективной гибридизации с комплементом цепи.

Применительно к полипептидам понятие "существенная гомология" означает, что в двух полипептидах или обозначающих их последовательностях при оптимальном выравнивании и сравнении с учетом соответствующих инсерций или делеций аминокислот по меньшей мере примерно 80% нуклеотидов, по меньшей мере примерно от 90 до 95% или примерно от 98 до 99,5% аминокислот являются идентичными.

Процент идентичности двух последовательностей является функцией количества идентичных положений, имеющих в последовательностях (т.е. % гомологии=количество идентичных положений/общее количество положений×100), с учетом количества "брешей" и длины каждой "бреши", которые требуется интродуцировать для осуществления оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно осуществлять с использованием математического алгоритма, как описано ниже в примерах, не ограничивающих объем изобретения.

Процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей можно определять с использованием программы GAP, входящей в пакет программ GCG (доступна на сайте в сети интернет web.gcg.com), с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и веса "бреши" 40, 50, 60, 70 или 80 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно определять также с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4, 1989, с. 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов остатков, штраф за длину "бреши" 12 и штрафа за "брешь" 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48), 1970, с. 444-453), который включен в программу GAP, входящую в пакет программ GCG (доступна на сайте в сети интернет web.gcg.com), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и веса бреши 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Нуклеотидные и белковые последовательности, представленные в настоящем описании, можно применять также в качестве "запрашиваемой последовательности" для осуществления поиска в публичных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно осуществлять с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0), описанных у Altschul и др., *J. Mol. Biol.*, 215, 1990, с. 403-410. Поиски нуклеотидных последовательностей с помощью алгоритма BLAST можно осуществлять с использованием программы NBLAST, балл=100, длина слова=12 с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, представленным в настоящем описании. Поиски белковых последовательностей с помощью алгоритма BLAST можно осуществлять с использованием программы XBLAST, балл=50, длина слова=3 с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков, представленным в настоящем описании. Для осуществления выравниваний с использованием брешей для целей сравнения можно приме-

нять программу Gapped BLAST согласно процедуре, описанной у Altschul и др., *Nucleic Acids Res.*, 25(17), 1997, с. 3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см. www.worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически очищенной форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или рассматривается как "практически чистая", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, от других присутствующих в клетке нуклеиновых кислот (например, от других частей хромосомы) или белков, с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг (разделение в CsCl), хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие хорошо известные в данной области методы (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Нуклеиновые кислоты, например, кДНК, можно подвергать мутации согласно стандартным методам для получения генных последовательностей. В случае кодирующих последовательностей указанные мутации могут оказывать влияние на аминокислотную последовательность, если это требуется. В частности, можно рассматривать последовательности ДНК, практически гомологичные или имеющие происхождение из нативных сегментов генов V, D, J, константных последовательностей, переключателей и других аналогичных последовательностей, представленных в настоящем описании (где понятие "имеющий происхождение" означает, что последовательность идентична другой последовательности или получена из нее путем модификации).

В контексте настоящего описания понятие "вектор" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она сцеплена. Одним из типов вектора является "плаزمид", это понятие относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую можно встраивать посредством лигирования дополнительные ДНК-сегменты. Другим типом вектора является вирусный вектор, в этом случае дополнительные ДНК-сегменты можно встраивать путем лигирования в вирусный геном. Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они интродуцированы (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации, и эписомальные векторы для клеток млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы для клеток млекопитающих) можно интегрировать в геном клетки-хозяина путем интродукции в клетку-хозяина, где происходит их репликация наряду с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы обладают способностью направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в контексте настоящего описания обозначают как "рекомбинантные экспрессионные векторы" (или просто "экспрессионные векторы"). В целом экспрессионные векторы, применяемые в методах рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании понятия "плазмид" и "вектор" можно применять взаимозаменяемо, поскольку плазмид представляет собой наиболее широко применяемую форму вектора. Однако понятие включает также и другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы с дефективной репликацией), которые выполняют эквивалентные функции.

В контексте настоящего описания понятие "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначено для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, не присутствующую в естественных условиях в клетке, и она может представлять собой клетку, в которую интродуцирован рекомбинантный экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие понятия относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но также и к потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут возникать определенные модификации либо вследствие мутаций, либо обусловленные влиянием окружающей среды, то такое потомство фактически не может быть идентичным родительской клетке, но оно все еще подпадает под объем понятия "клетка-хозяин", применяемое в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "сцепленный" ("связанный") относится к ассоциации двух или большего количества молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь может быть также обусловлена генетическими причинами (т.е. получена путем рекомбинантного слияния). Такие связи можно создавать с помощью широкого разнообразия принятых в данной области методов, таких как химическая конъюгация и получение белка путем рекомбинации.

В контексте настоящего описания понятие "введение" относится к физической интродукции композиции, содержащей терапевтический агент, в организм индивидуума с помощью любых различных методов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Различные пути введения антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, включают внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, введение путем инъекции или инфузии. Понятие "парентеральное введение" в контексте настоящего описания обозначает пути введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает (но не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную, внутриаартериальную, внутриоболочечную, внутривнутрилимфатическую, внутрь повреждения, интракапсулярную, внутривнутриглазничную, внутрисердечную, внутривнутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутику-

лярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно этому антителу, представленное в настоящем описании, можно вводить непарентеральным путем, таким как местное введение, эпидермальный путь введения или введение через слизистую оболочку, например, интраназально, орально, вагинально, ректально, подъязычно или местно. Введение можно осуществлять, например, также однократно, несколько раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов времени.

В контексте настоящего описания понятия "ингибирует" или "блокирует" (например, применительно к ингибированию/блокированию связывания лиганда TREM-1 с TREM-1 на клетках) используют взаимозаменяемо и они включают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 ингибирует связывание лиганда для TREM-1 с TREM-1 по меньшей мере примерно на 50%, например, примерно на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% по данным оценки согласно представленным далее в настоящем описании методам. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 ингибирует связывание лиганда для TREM-1 с TREM-1 не более чем на 50%, например примерно на 40, 30, 20, 10, 5 или 1% по данным оценки согласно представленным далее в настоящем описании методам.

Понятия "лечить", "лечение" и "обработка" в контексте настоящего описания относятся к любому типу вмешательства или процессу, осуществляемому в отношении индивидуума, или к введению ему действующего вещества с целью реверсирования, облегчения, ослабления, ингибирования или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, серьезности или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимического показателя, ассоциированного с заболеванием, или повышения общей выживаемости. Можно осуществлять лечение индивидуума, имеющего заболевание, или индивидуума, не имеющего заболевания (например, для профилактики).

Понятие "эффективная доза" или "эффективная дозировка" обозначает количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого действия. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой количество лекарственного средства, которое при его применении индивидуально или в комбинации с другим терапевтическим агентом усиливает регресс заболевания, что проявляется в снижении серьезности симптомов заболевания, увеличении частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждении ухудшения или нетрудоспособности вследствие поражения заболеванием. Терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства включает "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективную дозу", которое/которая представляет собой любое количество лекарственного средства, которое, при введении индивидуально или в комбинации с другим терапевтическим агентом индивидууму, имеющему риск развития заболевания или страдающему рецидивом заболевания, ингибирует развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического агента усиливать регресс заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания, можно оценивать с помощью различных методов, известных практикующему специалисту, например, в процессе клинических испытаний на людях, с помощью систем с использованием животных моделей, позволяющих предсказывать эффективность в отношении человека, или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

Понятие "пациент" включает человека и других млекопитающих, которых подвергают профилактическому или терапевтическому лечению.

В контексте настоящего описания понятие "индивидуум" включает любого человека или животного кроме человека. Например, способы и композиции, представленные в настоящем описании, можно применять для лечения индивидуума, имеющего рак. Понятие "животное кроме человека" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы кроме человека, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д.

В контексте настоящего описания понятия "микрограмм" и "микромоль" используются взаимозаменяемо с понятиями "мкг" и "мкМ" соответственно.

В приведенных ниже подразделах различные аспекты изобретения, представленные в настоящем описании, описаны более подробно.

I. Антитела к TREM-1.

В настоящем описании представлены антитела, например, полностью человеческие антитела, которые обладают конкретными функциональными характеристиками или свойствами. Например, антитела, представленные в настоящем описании, специфически связываются с человеческим TREM-1 и более конкретно с определенным доменом (например, функциональным доменом) во внеклеточном домене человеческого TREM-1. В одном из вариантов осуществления изобретения антитела специфически связываются с сайтом на TREM-1, с которым связывается лиганд для TREM-1 (например, PGLYRP1). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой антагонистические антитела, т.е. они ингибируют или подавляют активность TREM-1 (т.е. не обладают агонистической активностью при связывании) на клетках, например, моноцитах, макрофагах и нейтрофилах. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 дают перекрестную реакцию с TREM-1 из одного

или нескольких приматов кроме человека, таких как TREM-1 обезьян циномогус. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 блокируют производство провоспалительных цитокинов (например, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-12 и их комбинаций) клетками (например, макрофагами, дендритными клетками, нейтрофилами) после активации. В других вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 содержат Fc-области, которые не связываются с одним или несколькими Fc γ R. В следующих вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 не индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов миелоидными клетками (например, дендритными клетками) и тем самым уменьшают цитокиновый шторм или предупреждают его наступление после введения антитела к TREM-1 индивидууму, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретные антитела к TREM-1, указанные в настоящем описании, представляют собой антитела, например, моноклональные, рекомбинантные и/или человеческие антитела, которые перекрестно конкурируют с mAb 0318 за связывание с человеческим TREM-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 перекрестно конкурируют также с mAb 0318 за связывание с TREM-1 обезьян циномогус. Иными словами, антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, в конкретных вариантах осуществления изобретения входят в ту же самую "группу", что и mAb 0318.

Антитело mAb 0318 имеет переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 15 (см. публикацию международной заявки на патент 2016/009086). mAb 0318 имеет также CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, которые соответствуют аминокислотам 31-35, 50-68 и 101-110 SEQ ID NO: 14 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела mAb 0318 соответствуют аминокислотам 24-38, 54-60 и 93-101 SEQ ID NO: 15.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, содержит VH и VL, имеющие SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно. В другом варианте осуществления изобретения VH антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR1, состоящую из аминокислот 31-35 (TYAMH) SEQ ID NO: 14, в которой одна из аминокислот может быть заменена на другую аминокислоту. В конкретных вариантах осуществления изобретения VH антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR2, состоящую из аминокислот 50-68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) SEQ ID NO: 14, в которой одна, две или три аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR3, состоящую из аминокислот 101-110 (DMGIRRQFAY) SEQ ID NO: 14, в которой одна, две или три аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения VL антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR1, состоящую из аминокислот 24-38 (QQSNQDPYT) SEQ ID NO: 15, в которой одна, две или три аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту. В других вариантах осуществления изобретения VL антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR2, состоящую из аминокислот 54-60 (RASNLES) SEQ ID NO: 15, в которой одна или две аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения VL антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR3, состоящую из аминокислот 93-101 (QQSNQDPYT) SEQ ID NO: 15, в которой одна или две аминокислоты могут быть заменены на другую аминокислоту.

Остатки метионина в CDR антител могут окисляться, что приводит к возможному химическому расщеплению и последующему снижению эффективности антитела. Следовательно, в антителах к TREM-1, представленных в настоящем описании, один или несколько остатков метионина в CDR тяжелой и/или легкой цепи могут быть заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному расщеплению. В некоторых вариантах осуществления изобретения остатки метионина в CDR1 и CDR3 тяжелой цепи заменяют на аминокислотные остатки, которые не подвергаются окислительному расщеплению (например, на глутамин или лейцин). Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения VH антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR3, состоящую из аминокислот 101-110 (DQGIRRQFAY) SEQ ID NO: 81 или аминокислот 101-110 (DLGIRRQFAY) SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления изобретения VH антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR1, состоящую из аминокислот 31-35 (TYAQH) SEQ ID NO: 83 или аминокислот 31-35 (TYALH) SEQ ID NO: 84. Равным образом в некоторых вариантах осуществления изобретения из антитела к TREM-1, прежде всего из CDR, могут быть удалены сайты дезаминирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения VH и VL антитела к TREM-1 содержат последовательности VH и VL антитела к TREM-1, описанные в публикации международной заявки на патент WO 2017/152102 A2, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения VL антитела к TREM-1 содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 9-27, представленных в WO 2017/152102, последовательность CDR2, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 28-40, представленных в WO 2017/152102, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 41-119, представленных в WO 2017/152102. В одном из вариантов осуществления изобретения VH антитела к TREM-

1 содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 120-143, представленных в WO 2017/152102, последовательность CDR2, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 144-172, представленных в WO 2017/152102, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 173-247, представленных в WO 2017/152102.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, содержат последовательности CDR и/или вариабельных областей, идентичные по меньшей мере на 80% (например, идентичные по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 99%) последовательностям CDR и/или вариабельных областей антитела mAb 0318.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащие SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 содержат тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), где HC содержит SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления изобретения LC содержит SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 396-475, представленных в WO 2017/152102, и/или вариабельную область легкой цепи (VL), выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 316-395, представленных в WO 2017/152102.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности, представленные в табл. 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело к TREM-1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54.

Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85 или 80% идентична любой из тяжелых и легких цепей, представленных в настоящем описании, например, в SEQ ID NO: 50-54, можно применять для создания антител к TREM-1, обладающих требуемыми характеристиками, например, такими, которые представлены ниже в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50, 51, 52 или 53, и где легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80 по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 или 100% аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM1 содержит константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, L234A, L235E, G237A, D356E, L358M и любой их комбинации (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, D356E, L358M и любой их комбинации (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, C226S, C229S, P238S и любой их комбинации (EU-нумерация). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D,

K214R, C226S, C229S, P238S и любой их комбинации (EU-нумерация).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью связываться с вариантами человеческого TREM-1 (например, изоформами 2 и 3 TREM-1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно) по данным оценки, например, методом поверхностного плазмонного резонанса. В другом варианте осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью связываться с TREM-1 обезьян циномоглус (SEQ ID NO: 7) по данным оценки, например, методом поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, связываются с человеческим TREM-1 с высокой аффинностью, например, характеризующейся величиной K_D , которая составляет по данным оценки с помощью BIACORE™ (например, согласно методу, описанному в разделе "Примеры") 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-7} М или от 10^{-9} до 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, связываются с TREM-1 обезьян циномоглус (супо), например, с величиной K_D , которая составляет по данным оценки с помощью BIACORE™ (например, согласно методу, описанному в разделе "Примеры") 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-7} М или от 10^{-9} до 10^{-7} М.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, представленные в настоящем описании, связываются с тем же самым одним или теми же самыми несколькими эпитопами на TREM-1, что и антитело mAb 0318. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с

(I) по меньшей мере одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, которая состоит из A21, T22, K23, L24, T25, E26 и любой их комбинации;

(II) по меньшей мере одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, которая состоит из A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, 157, 158, 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, 185 и любой их комбинации; и

(III) по меньшей мере одним аминокислотным остатком, выбранным из группы, которая состоит из C113, V114, 1115, Y116, Q117, P118, P119 и любой их комбинации, человеческого TREM-1 (например, изоформы 1, SEQ ID NO: 1) (см. WO 2016/009086).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с аминокислотами с D38 по F48 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1) по данным анализа, например, методом НХ-МС или дифракции в рентгеновских лучах. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп для антитела к TREM-1 содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или все из аминокислотных остатков D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 и L45 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1) и один, два или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из E46, K47 и F48 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), по данным анализа с помощью, например, НХ-МС или дифракции в рентгеновских лучах. В конкретных вариантах осуществления изобретения эпитоп для антитела к TREM-1 содержит один, два, три или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из D42, E46, D92 H93 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1), по данным анализа с использованием вариантов TREM-1 и метода поверхностного плазмонного резонанса.

В одном из вариантов осуществления изобретения эпитоп для антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, содержит по меньшей мере аминокислотные остатки E46 и/или D92 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1) по данным анализа с использованием вариантов TREM-1 и метода поверхностного плазмонного резонанса. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп для антитела к TREM-1 содержит один, два или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из L31, 186 и V101 из SEQ ID NO: 1 (человеческий TREM-1). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с полипептидом, содержащим аминокислотные остатки с E19 по L26 из TREM-1 обезьян циномоглус (SEQ ID NO: 7), по данным анализа, например, методом НХ-МС или дифракции в рентгеновских лучах.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с человеческим TREM-1, где эпитоп для антитела содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все из аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48 и A49 из SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с человеческим TREM-1, где эпитоп для антитела содержит D42 из SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает способностью специфически связываться с человеческим TREM-1, где эпитоп для антитела содержит E46 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп для антитела может содержать

V39, C41, D42, Y43, L45 из SEQ ID NO: 1. В следующих вариантах осуществления изобретения эпитоп для антитела может содержать E46, K47 и A49 из SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте осуществления изобретения эпитоп для антитела к TREM-1 может дополнительно содержать F48 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает профилем вязкости, сходным с профилем вязкости антитела mAb 0318. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, обладает вязкостью менее чем 5 сП, менее чем 4 сП, менее чем 3 сП, менее чем 2,5 сП, менее чем 2,4 сП, менее чем 2,3 сП, менее чем 2,2 сП, менее чем 2,1 сП, менее чем 2 сП, менее чем 1,9 сП, менее чем 1,8 сП, менее чем 1,7 сП, менее чем 1,6 сП, менее чем 1,5 сП, менее чем 1,4 сП, менее чем 1,3 сП, менее чем 1,2 сП, менее чем 1,1 сП, менее чем 1,0 сП, менее чем 0,9 сП, менее чем 0,8 сП, менее чем 0,7 сП, менее чем 0,6 сП, менее чем 0,5 сП, менее чем 0,4 сП, менее чем 0,3 сП, менее чем 0,2 сП или менее чем 0,1 сП при концентрации 80 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает вязкостью менее чем 10 сП (например, 9 сП) при концентрации 130 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, содержит мутации, в результате которых один или несколько отрицательно заряженных остатков в участках CDR1 и CDR3 легкой цепи антитела заменены на незаряженные остатки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит замену одного или нескольких из аминокислотных остатков D1, D30, D33, D74, D98, E27 и E97 из SEQ ID NO: 15 на аминокислотный остаток, выбранный из группы, которая состоит из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина и тирозина. Эти мутации обозначены в настоящем описании как "прячущие заряд" мутации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, содержит мутации в области взаимодействия Fab-Fab, имеющей SEQ ID NO: 14, для снижения димеризации Fab-Fab. Ранее для антитела mAb 0318 было установлено, что, поскольку антитела содержат два Fab, то, мультимеризация может влиять на вязкость. Такие мутации обозначают как мутации "Fab-Fab-взаимодействия". В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 содержит мутацию, заменяющую любой один из остатков Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 и R106 из SEQ ID NO: 14 или F32, D33, Y34, Y53, R54 и D98 из SEQ ID NO: 15 на аминокислотный остаток, выбранный из группы, которая состоит из глицина, аланина, серина, аспарагина, глутамина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, гистидина и тирозина.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, содержит мутацию в положении 32 из SEQ ID NO: 15, в результате которой фенилаланин заменен на аминокислоту, выбранную из следующих аминокислотных остатков: глицин, серин, треонин, цистеин, аланин, валин, лейцин, изолейцин и метионин. Применение такой мутации основано на обнаружении того факта, что замена Ala в положении Y90 из SEQ ID NO: 1 повышает аффинность SEQ ID NO: 3 к TREM-1. Было установлено, что Y90 взаимодействует с представляющим собой фенилаланин остатком SEQ ID NO: 15. Мутацию SEQ ID NO: 15, осуществляемую для усиления взаимодействия Fab-TREM-1, обозначают как мутация "Fab-TREM-1-взаимодействия". В настоящем описании представлены антитела к TREM-1, переменные области которых сцеплены (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые могут иметь любой аллотип или изоаллотип, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); for IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); и для K: Km, Km1, Km2, Km3 (см., например, Jeffries и др., mAbs 1, 2009, с. 1). В некоторых вариантах осуществления изобретения переменные области антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, сцеплены с не обладающим эффекторной функцией или практически не обладающим эффекторной функцией Fc, например, IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения переменные области антител к TREM-1 сцеплены с Fc, который характеризуется пониженной способностью к связыванию или не обладает способностью к связыванию с одним или несколькими FcγR.

В одном из вариантов осуществления изобретения VH-домен антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, может быть слит с константным доменом человеческого IgG (т.е. Fc), например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может быть встречающимся в естественных условиях или модифицированным, как, например, дополнительно указано в настоящем описании. Например, VH-домен может содержать аминокислотную последовательность любого VH-домена, представленного в настоящем описании, слитую с константным доменом человеческого IgG, например IgG1, имеющим аминокислотную последовательность константного домена человеческого IgG1 дикого типа:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

или последовательность аллотипического варианта SEQ ID NO: 9, и имеющим следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
 LLSLSPGK (SEQ ID NO: 77;

специфические для аллотипа аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты).

В одном из вариантов осуществления изобретения VH-домен антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, может содержать аминокислотную последовательность любого VH-домена, представленного в настоящем описании, слитую с не обладающей эффекторной функцией константной областью, например со следующими аминокислотными последовательностями не обладающего эффекторной функцией константного домена человеческого IgG1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 78;

"IgG1.1f", содержащей замены L234A, L235E, G237A, A330S и P331S (EU-нумерация, указанные замены подчеркнуты) или

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK (SEQ ID NO: 79;

"IgG1.1f", содержащей замены L234A, L235E и G237A (EU-нумерация, указанные замены подчеркнуты).

Например, аллотипический вариант IgG1 содержит K97R, D239E и/или L241M (подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, см. выше), и их нумерация соответствует нумерации SEQ ID NO: 77-79. В полноразмерной области тяжелой цепи и в соответствии с EU-нумерацией указанные аминокислотные замены имеют следующие номера K214R, D356E L358M. В некоторых вариантах осуществления изобретения константная область антитела к TREM-1 дополнительно содержит одну или несколько мутаций или замен аминокислот L117, A118, G120, A213 и P214 (выше подчеркнуты), если они пронумерованы как в SEQ ID NO: 77-79, или L234, A235, G237, A330 и P331 в соответствии с EU-нумерацией. В следующих вариантах осуществления изобретения константная область антитела к TREM-1 содержит одну или несколько мутаций или замен аминокислот L117A, A118E, G120A, A213S и P214S в SEQ ID NO: 77-79 или с номерами L234A, L235E, G237A, A330S и P331S согласно EU-нумерации. Константная область антитела к TREM-1 может содержать также одну или несколько мутаций или замен L117A, A118E и G120A в SEQ ID NO: 9 или L234A, L235E и G237A согласно EU-нумерации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения VH-домен антител к TREM-1, представленных

в настоящем описании, содержит аминокислотную последовательность любого VH-домена, представленного в настоящем описании, слитого с константным доменом IgG1, содержащим следующие аминокислотные последовательности:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTS
PPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 11;

"IgG1-Aba", содержащая замены K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация), которые подчеркнуты); или

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTS
PPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 12;

"IgG4-Aba", содержащая замены S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S и P238S (EU-нумерация), которые подчеркнуты).

VL-домен, представленный в настоящем описании, может быть слит с константным доменом человеческой легкой каппа- или лямбда-цепи. Например, VL-домен антитела к TREM-1 может содержать аминокислотную последовательность любого VL-домена, представленного в настоящем описании, слитую со следующей аминокислотной последовательностью легкой каппа-цепи человеческого IgG1:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 13)

В конкретных вариантах осуществления изобретения константная область тяжелой цепи содержит на C-конце лизин или другую аминокислоту, например, она содержит следующие аминокислоты: LSPGK (SEQ ID NO: 48) в тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления изобретения в константной области тяжелой цепи на C-конце отсутствуют одна или несколько аминокислот, и она имеет, например, C-концевую последовательность LSPG (SEQ ID NO: 49) или LSP.

В одном из вариантов осуществления изобретения переменная область антитела к TREM-1 сцеплена с не обладающей эффекторной функцией или практически не обладающей эффекторной функцией Fc. В конкретных вариантах осуществления изобретения переменная область антитела к TREM-1 сцеплена с Fc, выбранной из группы, которая состоит из IgG1.1f, IgG1.3f, IgG1-Aba и IgG4-Aba, представленных в настоящем описании.

Как правило, переменные области, представленные в настоящем описании, могут быть сцеплены с Fc, содержащей одну или несколько модификаций, осуществленных, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как связывание Fc-рецептора, высвобождение провоспалительных цитокинов, время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента и/или антителозависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело, представленное в настоящем описании, может быть химически модифицировано (например, к антителу могут быть присоединены один или несколько химических фрагментов) или модифицировано для изменения его гликозилирования, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из таких вариантов осуществления изобретения более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу Кэбота.

Fc-область включает домены, происходящие из константной области иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и других классов, таких как IgA, IgD, IgE и IgM), включая фрагмент, аналог, вариант, мутант или производное константной области. Константная область иммуноглобулина представляет собой встречающийся в естественных условиях или полученный синтетическим путем полипептид, гомологичный C-концевой области иммуноглобулина, и она может включать CH1-домен, шарнир, CH2-домен, CH3-домен или CH4-домен по отдельности или в комбинации.

Молекулы Ig взаимодействуют с несколькими классами клеточных рецепторов. Например, молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fcγ-рецепторов (FcγR), специфических в отношении антитела

IgG-класса, а именно FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Опубликованы данные о том, что последовательности, имеющие важное значение для связывания IgG с FcγR-рецепторами, локализованы в CH2- и CH3-доменах. Способность указанного антитела к связыванию с Fc-рецептором (FcR) влияет на время полужизни антитела в сыворотке.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область антител к TREM-1 представляет собой вариант Fc-области, например, имеет последовательность Fc, которая модифицирована (например, путем аминокислотной замены, делеции и/или инсерции) по сравнению с родительской последовательностью Fc (например, немодифицированного полипептида Fc, который затем модифицируют для создания варианта) для обеспечения требуемых структурных характеристик и/или биологической активности.

Например, можно осуществлять модификации в Fc-области для создания варианта Fc, который обладает

(а) повышенной или пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC);

(б) повышенной или пониженной комплемент-опосредованной цитотоксичностью (CDC);

(в) повышенной или пониженной аффинностью к C1q; и/или

(г) повышенной или пониженной аффинностью к Fc-рецептору по сравнению с родительской Fc.

Такие варианты Fc-области, как правило, должны содержать по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области. Считается, что особенно предпочтительной является комбинация аминокислотных модификаций. Например, вариант Fc-области может включать две, три, четыре, пять и т.д. замен, например, в указанных в настоящем описании специфических положениях в Fc-области.

Вариант Fc-области может иметь также изменение последовательности, в результате чего аминокислоты, участвующие в формировании дисульфидной связи, удаляют или заменяют на другие аминокислоты. Такое удаление может позволять избегать взаимодействия с другими содержащими цистеин белками, присутствующими в клетке-хозяине, применяемой для получения антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании. Даже в том случае, когда остатки цистеина удалены, одноцепочечные Fc-домены все еще могут формировать димерный Fc-домен, в котором они присутствуют вместе, посредством нековалентного взаимодействия. В других вариантах осуществления изобретения Fc-область можно модифицировать для ее большей совместимости с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалять РА-последовательность, присутствующую вблизи N-конца типичной нативной Fc-области, которая может распознаваться пищеварительным ферментом в *E.coli*, таким как пролинспецифическая иммунопептидаза. В других вариантах осуществления изобретения можно удалять один или несколько сайтов гликозилирования в Fc-домене. Остатки, которые, как правило, гликозилируются (например, аспарагин), могут обеспечивать цитолитический ответ. Такие остатки можно удалять или замещать на негликозилированные остатки (например, аланин). В других вариантах осуществления изобретения в Fc-области можно удалять сайты, участвующие во взаимодействии с комплементом, такие как сайт связывания C1q. Например, можно удалять путем делеции или заменять последовательность ЕКК человеческого IgG1. В конкретных вариантах осуществления изобретения можно удалять сайты, которые влияют на связывание с Fc-рецепторами, предпочтительно сайты, отличные от сайтов связывания с рецептором спасения. В других вариантах осуществления изобретения можно модифицировать Fc-область с целью удаления ADCC-сайта. ADCC-сайты известны в данной области; см., например, Sarmay и др., *Molec. Immunol.*, 29 (5), 1992, с. 633-639 касательно ADCC-сайтов в IgG1. Конкретные примеры вариантов Fc-доменов описаны, например, в WO 97/34631 и WO 96/32478.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицируют шарнирную область Fc таким образом, чтобы изменить, например, увеличивать или уменьшать, количество остатков цистеина в шарнирной области. Этот подход описан подробно в US № 5677425 на имя Bodmer и др. Количество остатков цистеина в шарнирной области Fc изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для повышения или снижения стабильности антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения шарнирную область Fc антитела подвергают мутации для уменьшения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, интродуцируют одну или несколько аминокислотных мутаций в поверхность раздела CH2-CH3-домена шарнирного Fc-фрагмента таким образом, чтобы у антитела снизилась способность к связыванию белка A Staphylococcy (SpA) по сравнению со способностью к связыванию SpA антитела, имеющего нативный шарнирный фрагмент Fc. Этот подход описан более подробно в US № 6165745 на имя Ward и др.

В следующих вариантах осуществления изобретения Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторной(ых) функции(й) антитела. Например, можно заменять одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330 и/или 331, на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы антитело имело измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент системы комплемента. Этот подход описан более подробно в патентах US № 5624821 и US № 5648260,

оба на имя Winter и др.

В другом примере можно заменять одну или несколько аминокислот из числа аминокислотных остатков в положениях 329, 331 и 322 на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы изменять способность антитела к связыванию C1q и/или снизить комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или элиминировать ее. Этот подход описан более подробно в US № 6194551 на имя Idusogie и др.

В другом примере можно заменять один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239, чтобы тем самым изменять способность антитела к фиксации комплемента. Этот подход описан более подробно в публикации PCT WO 94/29351 на имя Vodmer и др.

Еще в одном примере можно модифицировать Fc-область для уменьшения антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или для уменьшения аффинности к Fcγ-рецептору путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. Примеры замен включают 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Примеры вариантов включают 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Другие модификации для усиления взаимодействий с FcγR и комплементом включают (но не ограничиваясь только ими) замены 298A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 и 396L. Обзор этих и других модификаций представлен у Strohl, Current Opinion in Biotechnology 20, 2009, с. 685-691.

Другими модификациями Fc, которые можно осуществлять в Fc, являются модификации, предназначенные для снижения или элиминации способности к связыванию с FcγR и/или белками системы комплемента, в результате чего происходит снижение или элиминация Fc-опосредуемых эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и CDC. Примеры модификаций включают (но не ограничиваясь только ими) замены, инсерции и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, 328, 330 и/или 331 (например, 330 и 331) (нумерация соответствует EU-индексу). Примеры замен включают (но не ограничиваясь только ими) 234A, 235E, 236R, 237A, 267R, 269R, 325L, 328R, 330S и 331S (например, 330S и 331S) (нумерация соответствует EU-индексу). Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации, предназначенные для уменьшения взаимодействий с FcγR и комплементом, включают замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V, а также устранение гликозилирования в положении 297 посредством мутаций или ферментативным путем, или посредством производства в организмах, таких как бактерии, в которых не происходит гликозилирование белков. Обзор этих и других модификаций представлен у Strohl, Current Opinion in Biotechnology, 20, 2009, с. 685-691.

Необязательно Fc-область может содержать не встречающийся в естественных условиях аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области (см., например, US № 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; публикации международных заявок на патент WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/0201 14).

Аффинности и способности к связыванию Fc-области с ее лигандом можно определять с помощью различных методов анализа *in vitro* (биохимических и иммунологических анализов), известных в данной области, включая (но не ограничиваясь только ими) равновесные методы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммунный анализ (RIA)), или кинетические (например, BIACORE-анализ) и другие методы, такие как непрямой анализ связывания, анализ конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В этих и других методах можно использовать метку на одном или нескольких подлежащих исследованию компонентах и/или применять различные методы обнаружения, включая (но не ограничиваясь только ими) хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание вопросов, касающихся аффинности связывания и кинетики, представлено в Fundamental immunology, 4-е изд., под ред. Paul W.E., изд-во Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999, где основное внимание сфокусировано на взаимодействиях антитело-иммуноген.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, содержат Fc, которая обладает пониженной способностью или не обладает способностью к связыванию с FcγR. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 имеет пониженную аффинность связывания с FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD 6b) или любой их комбинацией по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 обладает аффинностью связыва-

ния с Fc γ RI (CD64), сниженной по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в шесть раз, по меньшей мере в семь раз, по меньшей мере в восемь раз, по меньшей мере в девять раз или по меньшей мере в 10 раз по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 содержат вариант Fc IgG1, содержащий

(а) одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E, G237A и любой их комбинации (EU-нумерация);

(б) одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из L234A, L235E, G237A, A330S, P331S и любой их комбинации (EU-нумерация);

(в) одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из K214R, C226S, C229S, P238S и любой их комбинации (EU-нумерация); или

(г) одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, P238S и любой их комбинации (EU-нумерация).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, имеет

(а) изотип IgG1 и содержит одну или несколько аминокислотных замен аминокислотного остатка в Fc-области, выбранных из группы, которая состоит из

N297A, N297Q, D270A, D265A,

L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G,

P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E,

L328E, P238D, S267E, L328F, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R

и любой их комбинации, где нумерация остатков соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота, или имеет аминокислотную делецию в Fc-области в положении, соответствующем глицину 236;

(б) изотип IgG2 и содержит одну или несколько аминокислотных замен аминокислотного остатка в Fc-области, выбранных из группы, которая состоит из

P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q,

A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E

и любой их комбинации, где нумерация остатков соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота; или

(в) изотип IgG4 и содержит одну или несколько аминокислотных замен аминокислотного остатка в Fc-области, выбранных из группы, которая состоит из

E233P, F234V, L234A/F234A, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P,

L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q

и любой их комбинации, где нумерация остатков соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота.

В некоторых вариантах осуществления изобретения

(а) Fc-область дополнительно содержит также одну или несколько аминокислотных замен аминокислотного остатка, выбранных из группы, которая состоит из A330L, L234F; L235E, P331S, и любой их комбинации, где нумерация остатков соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота;

(б) Fc-область содержит также одну или несколько дополнительных аминокислотных замен аминокислотного остатка, выбранных из группы, которая состоит из M252Y, S254T, T256E, и любой их комбинации, где нумерация остатков соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота; или

(в) Fc-область дополнительно содержит аминокислотную замену S228P, где нумерация соответствует EU-нумерации или нумерации Кэбота (см. WO 2017/152102).

В конкретных вариантах осуществления изобретения выбирают Fc, характеризующуюся пониженной способностью к фиксации комплемента. Примером Fc, например, Fc IgG1, с пониженной способностью к фиксации комплемента является Fc, которая имеет следующие две аминокислотные замены: A330S и P331S.

В конкретных вариантах осуществления изобретения выбирают Fc, которая практически не обладает эффекторной функцией, т.е. характеризуется пониженной способностью к связыванию с Fc γ R и пониженной способностью к фиксации комплемента. Примером Fc, например, Fc IgG1, которая не обладает эффекторной функцией, является Fc, содержащая следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

II. Физические свойства антител.

Антитела к TREM-1, например, представленные в настоящем описании, обладают некоторыми или

всеми физическими характеристиками специфических антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, такими как характеристики, описанные в разделе "Примеры".

Сайты гликозилирования, прежде всего присутствующие в варибельных областях, могут обуславливать повышенную иммуногенность антитела или изменение значения pK антитела вследствие изменения связывания с антигеном (Marshall и др., *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 1972, с. 673-702; Gala и Morrison, *J. Immunol.* 172, 2004, с. 5489-5494; Wallick и др., *J. Exp. Med.*, 168, 1988, с. 1099-1109; Spiro, *Glycobiology*, 12, 2002, с. 43R-56R; Parekh и др., *Nature*, 316, 1985, с. 452-457; Mimura и др., *Mol. Immunol.* 37, 2000, с. 697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, не имеют или имеют пониженный уровень гликозилирования варибельной области. Это может быть достигнуто путем отбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в варибельной области, или путем мутации остатков в области гликозилирования. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1, представленное в настоящем описании, является менее иммуногенным по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 не содержат сайтов изомеризации аспарагина. Дезаминирование аспарагина может иметь место на последовательностях N-G или D-G, и оно приводит к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который приводит к изгибу полипептидной цепи и уменьшению ее стабильности (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело должно характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (p_i), которая, как правило, находится в диапазоне значений pH от 6 до 9,5. p_i для антитела IgG1-подкласса, как правило, находится в диапазоне значений pH 7-9,5, а p_i для антитела IgG4-подкласса, как правило, находится в диапазоне значений 6-8. Предполагается, что антитела с p_i , находящейся за пределами нормального диапазона, могут характеризоваться некоторой степенью развертки белка и нестабильностью в условиях *in vivo*. Так, антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, могут иметь значение p_i , которое находится в нормальном диапазоне (например, 8-9). Это может быть достигнуто либо путем отбора антител со значением p_i , находящимся в нормальном диапазоне, либо посредством мутации находящихся на поверхности заряженных остатков.

Каждое антитело должно иметь характерную температуру плавления, при этом чем выше температура плавления, тем больше общая стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R. и Manning M.C., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3, 2002, с. 361-371). Как правило, T_{mi} (температура начала развертки) может быть выше 60°C, выше 65°C или выше 70°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, имеют более высокую температуру плавления по сравнению с антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, имеют более высокую термостабильность по сравнению с референс-антителом, содержащим тяжелую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, которая состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54, по данным измерений, например, с помощью капиллярного дифференциального сканирующего калориметра (CAP-DSC). Температуру плавления антитела можно измерять методом дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen и др., *Pharm. Res.* 20, 2003, с. 1952-1960; Ghirlando и др., *Immunol. Lett.*, 68, 1999, с. 47-52) или кругового дихроизма (Murray и др., *J. Chromatogr. Sci.*, 40, 2002, с. 343-349). В некоторых вариантах осуществления изобретения состояние примерно от 10 до 20%, примерно от 20 до 30% (например, 24%) или примерно от 30 до 40% антитела является обратимым при нагреве до 77°C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании не подвергаются быстрой деградации. Деградацию антитела можно оценивать с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-МС (Alexander A.J., Hughes D.E., *Anal. Chem.*, 67, 1995, с. 3626-3632).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, характеризуются минимальной способностью к агрегации, которая может приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или к возникновению измененных или неблагоприятных фармакокинетических свойств. Как правило, антитела являются приемлемыми при уровне агрегации 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее или 5% или менее. Агрегацию можно оценивать с помощью нескольких методов, включая гель-фильтрацию на колонках (SEC), жидкостную хроматографию высокого разрешения (ЖХВР) и динамическое рассеяние света (DLS). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, являются мономерами по данным анализа методом гель-фильтрации-жидкостной хроматографии высокого разрешения (ГФ-ЖХВР). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к TREM-1 характеризуются минимальным риском фрагментации по данным оценки методом двумерной жидкостной

хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (2D-ЖХ/МС) или интактного масс-спектрометрического анализа методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/МС).

III. Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки.

Другим объектом изобретения являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота считается "выделенной" или "рассматривается как практически чистая", если она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других присутствующих в клетке нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например хромосомной ДНК, сцепленной в естественных условиях с выделенной ДНК) или белков, с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, обработку рестриктазами, электрофорез в агарозном геле и другие хорошо известные в данной области методы (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Нуклеиновая кислота, указанная в настоящем описании, может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать или может не содержать интронные последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными с использованием трансгенных мышей, несущих гены человеческих иммуноглобулинов, что более подробно описано ниже), кДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, продуцируемого гибридомой, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации или методов клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с помощью методов фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделять из библиотеки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, кодируют последовательности VH и VL антител к TREM-1, представленных в настоящем описании. Примеры последовательностей ДНК, кодирующих последовательности VH и VL, представлены в SEQ ID NO: 58-61 и SEQ ID NO: 62-65 соответственно.

Способ получения антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, может включать осуществление экспрессии тяжелых цепей и легких цепей в линии клеток, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи с сигнальным пептидом, например SEQ ID NO: 58-61 и SEQ ID NO: 62-65 соответственно. Клетки-хозяева, содержащие такие нуклеотидные последовательности, подпадают под объем настоящего изобретения.

После получения ДНК-фрагментов, кодирующих сегменты VH и VL, указанные ДНК-фрагменты можно подвергать дополнительным манипуляциям с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов варибельной области в гены полноразмерного антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. При осуществлении этих манипуляций кодирующий VL или VH ДНК-фрагмента функционально связывают с другим ДНК-фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "функционально связанный" означает, что два ДНК-фрагмента соединены таким образом, чтобы аминокислотные последовательности, кодируемые двумя ДНК-фрагментами, оставались в рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую VH-область, можно превращать в ген полноразмерной тяжелой цепи посредством функциональной связи кодирующей VH ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности человеческих генов константной области тяжелой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, 1991) и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например константную область IgG2 и/или IgG4. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента кодирующую ДНК VH можно функционально связывать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую VL-область можно превращать в ген полноразмерной легкой цепи (а также в ген легкой цепи Fab) посредством функциональной связи кодирующей ДНК VL с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности человеческих генов константной области легкой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, 1991) и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или ламбда-цепи.

Другим объектом настоящего изобретения являются клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, и соот-

ветствующие полинуклеотиды и экспрессионные вектора. В настоящем описании представлены также векторы, содержащие полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к TREM-1 или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы можно применять для осуществления рекомбинантной экспрессии антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, в клетках-хозяевах, например, в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы можно применять для генной терапии.

Пригодные согласно настоящему описанию векторы включают экспрессионные векторы, вирусные векторы и плазмидные векторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор.

В контексте настоящего описания понятие "экспрессионный вектор" относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности, или в случае вектора для вирусной РНК элементы, необходимые для репликации и трансляции после интродукции в соответствующую клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

Экспрессионные векторы, представленные в настоящем описании, могут включать полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленное/представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения кодирующие последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента функционально связаны с последовательностью, контролирующей экспрессию. В контексте настоящего описания считается, что две нуклеотидные последовательности функционально связаны, если они ковалентно связаны таким образом, чтобы для каждого компонента нуклеотидной последовательности обеспечивалось сохранение его функциональности. Считается, что кодирующая последовательность и контролирующая генную экспрессию последовательность функционально связаны, если они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция, и/или трансляция кодирующей последовательности находилась под влиянием или контролировалась контролирующей генную экспрессию последовательностью. Считается, что две ДНК-последовательности функционально связаны, если индукция промотора в 5'-области экспрессируемой последовательности гена приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя ДНК-последовательностями

- (1) не приводит к интродукции мутации сдвига рамки считывания;
- (2) не ухудшает способность промоторной области контролировать транскрипцию кодирующей последовательности; или
- (3) не ухудшает способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок.

Так, экспрессируемая последовательность гена может быть функционально связана с кодирующей нуклеотидной последовательностью, если экспрессируемая последовательность гена способна осуществлять транскрипцию указанной кодирующей нуклеотидной последовательности, в результате чего полученный транскрипт транслируется в требуемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вирусные векторы включают (но не ограничиваясь только ими) нуклеотидные последовательности из следующих вирусов: ретровирус, такой как вирус мышинного лейкоза Молони, вирус мышинной саркомы Харви, вирус мышинной опухоли молочной железы и вирус саркомы Рауса; лентивирус; аденовирус; аденоассоциированный вирус; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус коровьей оспы; полиовирус; и РНК-вирус, такой как ретровирус. Является приемлемым применение других векторов, хорошо известных в данной области. Конкретные вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых не имеющие решающего значения гены заменены на представляющий интерес ген. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы разрешены для опытов в терапии с использованием человеческих генов. Наиболее пригодными являются ретровирусы с дефицитом репликации (т.е. они способны управлять синтезом требуемых белков, но не способны продуцировать инфекционную частицу). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы широко применяют для осуществления высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы получения ретровирусов с дефицитом репликации (включая стадии встраивания экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекции плазмидой линии упаковывающих клеток, получение рекомбинантных ретровирусов линией упаковывающих клеток, сбор вирусных частиц из тканевой культуральной среды и инфицирование клеток-мишеней вирусными частицами) представлены у Kriegler M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, изд-во W.H. Freeman Co., New York, 1990; и Murry E.J., *Methods in Molecular Biology*, т. 7, изд-во Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, вирус, содержащий двухцепочечную ДНК. Аденоассоциированный вирус можно конструировать таким образом, чтобы он был вирусом с дефицитом репликации и был способен инфицировать широкий спектр типов клеток и видов. Он обладает дополнительными преимуществами, такими как термостабильность и стабильность в липидном растворителе; высокие частоты трансдукции в клетках различных линий, включая гематопозитические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, что

позволяет осуществлять несколько серий трансдукции. Опубликованы данные о том, что аденоассоциированный вирус может интегрироваться в ДНК человеческой клетки сайтспецифическим образом, что минимизирует возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность характеристик экспрессии встроенного гена при инфицировании ретровирусом. Кроме того, инфекции аденоассоциированного вируса дикого типа в культуре ткани прослеживались в течение более чем 100 пересевов в отсутствие селективного давления, это свидетельствует о том, что интеграция аденоассоциированного вируса в геном является сравнительно стабильным событием. Аденоассоциированный вирус может функционировать также вне хромосомы.

IV. Иммуноконъюгаты.

В настоящем описании представлены также иммуноконъюгаты, содержащие любые антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сцепленный с агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит биспецифическую молекулу, представленную в настоящем описании, сцепленную с агентом (например, таким как терапевтический агент или диагностический агент).

Для диагностических целей пригодными агентами являются обнаруживаемые метки, которые включают радиоизотопы для визуализации всего организма и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие пригодные для антитела метки, используемые для анализа образцов. Обнаруживаемыми метками, которые можно связывать с любым антителом к TREM-1, представленным в настоящем описании, могут служить любые метки из числа различных типов, применяемых в настоящее время в области диагностики *in vitro*, включая состоящие из частиц метки, в том числе металлические золи, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как I или ^{99}Tc , применяемые, например, с пептидным хелатирующим агентом типа N_2S_2 , N_3S или N_4 , хромофоры, включая флуоресцентные маркеры, люминесцентные маркеры, фосфоресцентные маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают рассматриваемый субстрат в обнаруживаемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляют после амплификации, осуществляемой, например, с помощью полимеразной цепной реакции. Пригодные ферментные метки включают пероксидазу из хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, которую обнаруживают путем оценки присутствия или генерирования хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантилметоксифосфорилоксифенилдиоксетан (AMPPD), динарий-3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1 3,7}декан}-4-ил)фенилфосфат) (CSPD), а также CDP и CDP-STAR® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных в данной области, например, хелатов пригодных лантанидов, таких как тербий(III) и европий(III). Средства обнаружения определяются выбранной меткой. Обнаружение метки или продуктов ее реакции можно осуществлять невооруженным глазом в том случае, когда метка состоит из частиц и накапливается соответствующих количествах, или с использованием инструментов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., во всех случаях в соответствии со стандартной практикой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения методами конъюгации получают связи, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например пептидные (т.е. амидные), сульфидные, (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые связи и связи на основе простого эфира. Эти связи являются практически неиммуногенными и характеризуются приемлемой стабильностью в сыворотке (см., например, Senter P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13, 2009, с. 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от биохимической природы фрагмента и антитела можно применять различные стратегии конъюгации. В том случае, если фрагмент представляет собой встречающийся в естественных условиях или рекомбинантный фрагмент, состоящий из 50-500 аминокислот, в учебниках по химии синтеза белковых конъюгатов описаны стандартные процедуры, которые легко может осуществлять специалист в данной области (см., например, Hackenberger C.P.R., Schwarzer D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47, 2008, с. 10030-10074). В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют взаимодействие малеинимидного фрагмента с остатком цистеина, присутствующим в антителе или его фрагменте. Такое взаимодействие представляет собой наиболее пригодную реакцию химического сочетания в случае применения, например, Fab- или Fab'-фрагмента антитела. Альтернативно этому в некоторых вариантах осуществления изобретения осуществляют сочетание с C-концевым участком антитела или фрагмента. C-концевую модификацию белка, например, Fab-фрагмента, можно осуществлять согласно методу, описанному у Sunbul M. и Yin J., *Org. Biomol. Chem.*, 7, 2009, с. 3361-3371).

В целом сайтспецифическое взаимодействие и ковалентное сочетание основано на трансформации встречающейся в естественных условиях аминокислоты в аминокислоту, реактивность которой ортогональна реактивности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в контексте редкой последовательности можно ферментативно превращать в альдегид (см. Frese M.A., Dierks T., *ChemBioChem.*, 10, 2009, с. 425-427). Требуемую аминокислотную модификацию можно создавать также путем использования специфической ферментативной реактивности определенных ферментов в отношении встречающейся в естественных условиях аминокислоты в контексте рассматриваемой последовательности (см., например, Taki M. и др., *Prot. Eng. Des. Sel.*, 17, 2004, с. 119-126; Gautier A. и др., *Chern.*

Biol., 15, 2008, с. 128-136; а катализируемое протеазой образование С-N-связей описано у Bordusa F., Highlights in Bioorganic Chemistry, 2004, с. 389-403). Сайтспецифическое взаимодействие и ковалентное сочетание можно осуществлять также посредством селективного взаимодействия концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами.

Для осуществления сайтспецифического ковалентного сочетания можно использовать реактивность N-концевого цистеина в отношении бензнитрилов (см. Ren H. и др., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 48, 2009, с. 9658-9662).

Нативное химическое лигирование может быть основано также на использовании С-концевых остатков цистеина (Taylor E. Vogel, Imperiali B., Nucleic Acids and Molecular Biology, 22 (Protein Engineering), 2009, с. 65-96).

В US № 6437095 В1 описан метод конъюгации, основанный на быстром взаимодействии цистеина, присутствующего в сегменте отрицательно заряженных аминокислот, с цистеином, находящемся в сегменте положительно заряженных аминокислот.

Фрагмент может представлять собой также синтетический пептид или пептидный миметик. В том случае, когда полипептид синтезируют химическим путем, в процессе такого синтеза можно встраивать аминокислоты с ортогональной химической реактивностью (см., например, de Graaf A.J. и др., Bioconj. Chem., 20, 2009, с. 1281-1295). Поскольку в распоряжении имеется большое разнообразие ортогональных функциональных групп и их можно интродуцировать в синтетический пептид, то конъюгация такого пептида с линкером является стандартной химической процедурой.

Для получения полипептида, несущего одну метку, конъюгат со стехиометрией 1:1 можно отделять от других побочных продуктов конъюгации с помощью хроматографии. Эту процедуру можно облегчать путем применения меченого красителем партнера по спариванию и несущего заряд линкера. Путем применения такого рода меченого и несущего большой отрицательный заряд партнера по спариванию легко можно отделять моноконъюгированные полипептиды от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку для разделения можно использовать разницу в заряде и молекулярной массе. Для очистки комплекса от несвязанных компонентов можно применять флуоресцентный краситель, такой как меченый одновалентный связывающий агент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, присоединенный к антителу к TREM-1, выбирают из группы, которая состоит из связывающего фрагмента, применяемого для мечения фрагмента и биологически активного фрагмента.

Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, можно конъюгировать также с терапевтическим агентом для получения иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Пригодные терапевтические агенты включают антимаболиты, алкилирующие агенты, агенты, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, кросслинкеры для ДНК, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназ, антибиотики и антимиотические агенты. Для получения ADC антитело и терапевтический агент предпочтительно конъюгируют с помощью расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 80), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC можно получать согласно методу, описанному в US № 7087600; 6989452 и 7129261; публикациях PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; и WO 08/103693; публикациях патентов US № 20060024317; 20060004081; и 20060247295.

Антитела к TREM-1, например, представленные в настоящем описании, можно применять также для обнаружения TREM-1, такого как человеческий TREM-1, например человеческий TREM-1, в тканях или образцах ткани. Антитела можно применять, например, в анализе ELISA или анализе методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 приводят в контакт с клетками, например, клетками в ткани, в течение периода времени, достаточного для осуществления специфического связывания, и затем добавляют реагент, например, антитело, которое обнаруживает антитело к TREM-1. Примеры анализов представлены в разделе "Примеры". Антитело к TREM-1 может представлять собой полностью человеческое антитело или оно может представлять собой химерное антитело, такое как антитело, имеющее человеческие переменные области и мышинные константные области или их фрагменты. Примеры методов обнаружения TREM-1, например, человеческого TREM-1, в образце (образце клетки или ткани) включают (I) приведение образца в контакт с антителом к TREM-1 в течение периода времени, достаточного для осуществления специфического связывания антитела к TREM-1 с TREM-1 в образце, и (II) приведение образца в контакт с реагентом для обнаружения, например, с антителом, которое специфически связывается с антителом к TREM-1, например, с Fc-областью антитела к TREM-1, для обнаружения TREM-1, связанного с антителом к TREM-1. После инкубации с антителом и/или реагентом для обнаружения можно применять стадии промывки. Антитела к TREM-1, применяемые в этих методах, не нуждаются в сеплении с меткой или агентами для обнаружения, поскольку агент для обнаружения можно применять отдельно.

Другие варианты применения антител к TREM-1, например, в монотерапии или в комбинированной терапии, представлены ниже, например, в разделе, посвященном комбинированной обработке.

V. Биспецифические молекулы.

Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, можно применять для создания биспецифических молекул. Антитело к TREM-1 или его антигенсвязывающие фрагменты можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), для создания биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Например, антитело к TREM-1 можно связывать с антителом или scFv, которое/который специфически связывается с любым белком, который можно использовать в качестве потенциальных мишеней для комбинированных обработок, такими как белки, представленные в настоящем описании (например, антителами к IP-10 или TNF- α). Фактически антитело, представленное в настоящем описании, можно дериватизировать или связывать более чем с одной другой функциональной молекулой для создания мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; подразумевается, что такие мультиспецифические молекулы также подпадают под понятие "биспецифическая молекула", используемое в настоящем описании. Для создания биспецифической молекулы, указанной в настоящем описании, антитело, представленное в настоящем описании, можно функционально связывать (например, посредством химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, с получением биспецифической молекулы.

Таким образом, в настоящем описании предложены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую связывающую специфичность для TREM-1 и вторую связывающую специфичность для второго эпитопа-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, в которых биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно обладать третьей связывающей специфичностью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифические молекулы, представленные в настоящем описании, содержат в качестве связывающей специфичности по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). Антитело может представлять собой также димер легкой цепи или тяжелой цепи, или любой минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечная конструкция, описанная в US 4946778 на имя Ladner и др.

Хотя предпочтительными являются моноклональные антитела, в биспецифических молекулах, представленных в настоящем описании, можно применять и другие антитела, такие как мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы, представленные в настоящем описании, можно получать путем конъюгации входящих в его состав связывающих специфичностей с помощью методов, известных в данной области. Например, каждую связывающую специфичность биспецифической молекулы можно создавать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда связывающие специфичности представляют собой белки или пептиды, то для ковалентной конъюгации можно применять разнообразные связывающие или перекрестно сшивающие агенты. Примеры перекрестно сшивающих агентов включают белок A, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karovsky и др., *J. Exp. Med.*, 160, 1984, с. 1686; Liu M.A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 1985, с. 8648). Другие методы включают методы, описанные у Paulus, Behring Ins. Mitt., № 78, 1985, с. 118-132; Brennan и др., *Science*, 229, 1985, с. 81-83; и у Glennie и др., *J. Immunol.*, 139, 1987, с. 2367-2375). Примерами конъюгирующих агентов являются SATA и сульфос-SMCC, оба соединения выпускаются фирмой Pierce Chemical Co. (Рокфорд, шт. Иллинойс).

Когда связывающие специфичности представляют собой антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания C-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирную область модифицируют таким образом, чтобы она до конъюгации содержала нечетное количество (предпочтительно один) сульфгидрильных остатков.

В альтернативном варианте обе специфичности связывания можно кодировать в одном и том же векторе и осуществлять их экспрессию и сборку в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод наиболее пригоден в том случае, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок типа МАТ×МАТ, МАТ×Fab, МАТ×(scFv)₂, Fab×F(ab')₂ или лиганд×Fab. Биспецифическое антитело может содержать антитело, содержащее scFv на C-конце каждой тяжелой цепи. Биспецифическая молекула, представленная в настоящем описании, может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения биспецифических молекул описаны, напри-

мер, в US № 5260203; US № 5455030; US № 4881175; US № 5132405; US № 5091513; US № 5476786; US № 5013653; US № 5258498; и US № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать с помощью известных в данной области методов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), FACS-анализ, биоанализ (например, анализ ингибирования роста) или анализ методом вестерн-блоттинга. Каждый из этих анализов позволяет обнаруживать присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, путем применения меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса.

VI. Наборы.

В настоящем описании предложены наборы, содержащие одно или несколько антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, или их антигенсвязывающих фрагментов, биспецифических молекул или их иммуноконъюгатов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложена/предложен фармацевтическая упаковка или набор, содержащая/содержащий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании, такими как одно или несколько антител, представленных в настоящем описании, или их антигенсвязывающих фрагментов, необязательно инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления изобретения наборы содержат фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, представленное в настоящем описании.

VII. Композиции и препаративные формы.

В настоящем описании предложены также композиции (например, фармацевтические композиции) и препаративные формы, содержащие одно или несколько антител к TREM-1 (включая полинуклеотиды, векторы и клетки, которые кодируют и/или экспрессируют антитела к TREM-1), представленные в настоящем описании. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или несколько антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, включенных в препаративную форму вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

В контексте настоящего описания понятие "фармацевтически приемлемый носитель" включает собой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности и замедления абсорбции и т.п., которые являются физиологически совместимыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения на активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, может быть нанесено покрытие из материала, защищающего соединение от действия кислот или других условий окружающей среды, которые инактивируют соединение.

Следовательно, одной из целей настоящего изобретения является создание фармацевтической препаративной формы, которая повышает стабильность антитела к TREM-1 и тем самым обеспечивает его длительное хранение. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая препаративная форма, представленная в настоящем описании, содержит

- (а) антитело к TREM-1;
- (б) забуферивающий агент;
- (в) стабилизатор;
- (г) соль;
- (д) наполнитель; и/или

(е) поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая препаративная форма сохраняет стабильность в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 5 лет или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения препаративная форма сохраняет стабильность при хранении при 4, 25 или 40°C.

Забуферивающий агент.

Забуферивающие агенты, которые можно применять согласно настоящему изобретению, могут представлять собой слабую кислоту или основание, используемую/используемое для поддержания уровня кислотности (рН) раствора, близкого к выбранному значению, после добавления другой кислоты или основания. Пригодные забуферивающие агенты могут повышать до максимума стабильность фармацевтических препаративных форм посредством поддержания контрольного значения рН препаративной формы. Пригодные забуферивающие агенты позволяют также обеспечивать физиологическую совместимость или оптимизировать растворимость. Реологические характеристики, вязкость и другие свойства также могут зависеть от значения рН препаративной формы. Обычные забуферивающие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) гистидин, цитрат, сукцинат, ацетат и фосфат. В некоторых вариантах осуществления изобретения забуферивающий агент содержит гистидин (например, L-гистидин) с обеспечивающими изотоничность агентами и может регулировать значение рН с помощью кислоты или

основания, известной/известного в данной области. В конкретных вариантах осуществления изобретения буферизующий агент представляет собой L-гистидин. В конкретных вариантах осуществления изобретения значение pH композиции поддерживают на уровне от примерно 2 до примерно 10 или от примерно 4 до примерно 8.

Стабилизатор.

Стабилизаторы добавляют к фармацевтическому продукту для стабилизации указанного продукта. Такие агенты могут обеспечивать стабилизацию белков многочисленными различными путями. Обычные стабилизаторы включают (но не ограничиваясь только ими) аминокислоты, такие как глицин, аланин, лизин, аргинин или треонин, углеводы, такие как глюкоза, сахароза, трегалоза, раффиноза или мальтоза, полиолы, такие как глицерин, маннит, сорбит, циклодекстрины или декстраны любого типа и имеющие любую молекулярную массу, или ПЭГ. В одном из объектов изобретения стабилизатор выбирают для повышения до максимума стабильности полипептида FIX в лиофилизированных препаратах. В конкретных вариантах осуществления изобретения стабилизатор представляет собой сахарозу и/или аргинин.

Наполнитель

Наполнители можно добавлять к фармацевтическому продукту для увеличения объема и массы продукта, облегчая тем самым осуществление точного дозирования и манипуляций с ним. Обычные наполнители включают (но не ограничиваясь только ими) лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит, сорбит, карбонат кальция или стеарат магния.

Поверхностно-активное вещество.

Поверхностно-активные вещества представляют собой амфипатические субстанции, имеющие лиофильные и лиофобные группы. Поверхностно-активное вещество может быть анионным, катионным, цвиттерийным или неионным. Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают (но не ограничиваясь только ими) алкилэтоксилат, нонилфенолэтоксилат, аминэтоксилат, полиэтиленоксид, полипропиленоксид, жирные спирты, такие как цетиловый спирт или олеиловый спирт, кокамид MEA, кокамид DEA, полисорбаты или додецилдиметиламиноксид. В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая препаративная форма, представленная в настоящем описании, содержит

- (а) антитело к TREM-1 в концентрации примерно от 0,25 до 250 мг/мл (например, от 10 до 200 мг/мл);
- (б) гистидин в концентрации примерно 20 мМ;
- (в) сахарозу в концентрации примерно 150 мМ;
- (г) аргинин в концентрации примерно 25 мМ; и
- (д) NaCl в концентрации примерно 50 мМ.

Препаративная форма может дополнительно содержать одну или несколько буферизующих систем, консервант, регулирующий тоничность агент, хелатирующий агент, стабилизатор и поверхностно-активное вещество, а также различные их комбинации. Применение консервантов, обеспечивающих изотоничность агентов, хелатирующих агентов, стабилизаторов и/или поверхностно-активных веществ в фармацевтических препаративных формах хорошо известно специалисту в данной области (см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19-е изд., 1995).

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая препаративная форма представляет собой водную препаративную форму. Такая препаративная форма, как правило, представляет собой раствор или суспензию, но может включать также коллоиды, дисперсии, эмульсии и многофазные продукты. Понятие "водная препаративная форма" обозначает препаративную форму, содержащую по меньшей мере 50 мас.% воды. Аналогично этому понятие "водный раствор" обозначает раствор, содержащий по меньшей мере 50 мас.% воды, а понятие "водная суспензия" обозначает суспензию, содержащую по меньшей мере 50 мас.% воды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая препаративная форма представляет собой высушенную замораживанием препаративную форму, к которой лечащий врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить в рамках комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать применение антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим агентом. Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинированной терапии, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или агенты, применяемые для лечения заболевания или нарушения (например, воспалительного нарушения). Такие соединения, лекарственные средства и/или агенты могут включать, например, противовоспалительные лекарственные средства или антитела, которые блокируют или снижают производство провоспалительных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтические агенты могут включать антитело к IP-10, антитело к TNF- α (например, адалимумаб (HUMIRA®), голимумаб (SIMPONI®), инфликсимаб (REMICADE®), цертолизумаба пегол (CIMZIA®)), интерферон бета-1a (например, AVONEX®, REBIF®), интерферон бета-1b (например, BETASERON®, EXTAVIA®), глати-

рамера ацетат (например, COPAXONE®, GLATOPA®), митоксантрон (например, NOVANTRONE®), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НСПВС), анальгетики, кортикостероиды и их комбинации.

Фармацевтические соединения, представленные в настоящем описании, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность родительского соединения и не оказывает никаких нежелательных токсикологических действий (см., например, Berge S.M. и др., J. Pharm. Sci., 66, 1977, с. 1-19). Примеры таких солей включают кислотнo-аддитивные соли и соли присоединения оснований. Кислотнo-аддитивные соли включают соли, образованные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая кислота и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, образованные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, может включать также фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают

- (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.;
- (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и
- (3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры пригодных водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях, представленных в настоящем описании, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и пригодные их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения пригодных материалов для покрытий, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Такие композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы и диспергаторы. Предупреждение присутствия микроорганизмов можно обеспечивать с помощью процедур стерилизации (см. выше) и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Может оказаться целесообразным включать в композиции агенты для придания изотоничности, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно обеспечивать пролонгированную абсорбцию инъецируемой фармацевтической формы путем применения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления предназначенных для немедленного введения стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных субстанций известно в данной области. Предусматривается их применение в фармацевтических композициях за исключением случаев, когда какая-либо/какой либо среда или агент является несовместимым с действующим веществом. Фармацевтическая композиция может содержать консервант или консервант может отсутствовать. В композицию могут быть включены дополнительные действующие вещества.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для включения лекарственного средства в высокой концентрации. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их пригодные смеси. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов пригодных для покрытий, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях композиции могут включать агенты для придания изотоничности, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъецируемых композиций можно обеспечивать путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратов и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно готовить путем включения действующего вещества в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости вместе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, и последующей стерилизации по-

средством микрофильтрации. Как правило, дисперсии приготавливают путем включения действующего вещества в стерильные наполнители, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных в настоящем описании. В случае стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных растворов для инъекций, примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из предварительно простерилизованного фильтрацией содержащего их раствора.

Количество действующего вещества, которое можно объединять с материалом носителя для получения лекарственной формы с однократной дозой, должно варьироваться в зависимости индивидуума, подлежащего лечению, и конкретного пути введения. Количество действующего вещества, которое можно объединять с материалом носителя для получения лекарственной формы с однократной дозой, как правило, должно представлять собой количество композиции, которое оказывает терапевтическое действие. Как правило, это количество, за исключением случая, когда оно составляет 100%, может варьироваться в пределах от примерно 0,01% до примерно 99% действующего вещества, от примерно 0,1% до примерно 70% или от примерно 1% до примерно 30% действующего вещества, входящего в комбинацию с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования регулируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько разделенных доз в течение определенного промежутка времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как в случае острой необходимости, обусловленной терапевтической ситуацией. Наиболее предпочтительно приготавливать парентеральные композиции в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и обеспечения единообразия доз. В контексте настоящего описания понятие "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для индивидуумов, подлежащих лечению; где каждая единица содержит действующее вещество в заранее определенном количестве, которое рассчитано для достижения требуемого терапевтического действия, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм, представленных в настоящем описании, диктуется и прямо связана с

(а) уникальными характеристиками действующего вещества и конкретным терапевтическим действием, которое требуется достичь; и

(б) ограничениями, существующими в области рецептов с использованием действующего вещества для лечения восприимчивых индивидуумов.

Для введения антитела к TREM-1, например, представленного в настоящем описании, применяют дозы, находящиеся в пределах от примерно 0,0001 до 100 мг/кг и более, как правило от 0,01 до 5 или 10 мг/кг веса тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг веса тела, 1 мг/кг веса тела, 3 мг/кг веса тела, 5 мг/кг веса тела или 10 мг/кг веса тела или могут находиться в пределах 1-10 мг/кг. Примеры режимов обработки включают введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Примеры режимов дозирования антитела к TREM-1, представленного в настоящем описании, включают внутривенное введение в дозе 1 мг/кг веса тела или 3 мг/кг веса тела, где антитело вводят с использованием одной из следующих схем дозирования:

(I) каждые четыре недели, осуществляя шесть введений дозы, затем каждые три месяца;

(II) каждые три недели;

(III) однократно в дозе 3 мг/кг веса тела, затем в дозе 1 мг/кг веса тела каждые три недели.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 вводят в постоянной дозе (режим постоянного дозирования). В других вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 вводят в фиксированной дозе с другим антителом. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело к TREM-1 вводят в дозе, рассчитанной на основе веса тела.

В некоторых методах вводят одновременно два или несколько моноклональных антител с различными связывающими специфичностями, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в указанных диапазонах. Антитело, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между введениями отдельных доз могут составлять, например, одну неделю, один месяц, три месяца или один год. Интервалы могут быть также неравномерными и их можно определять в зависимости от измеренных уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В некоторых методах дозу регулируют до достижения концентрации антитела в плазме, составляющей примерно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых методах примерно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в составе препаративной формы с пролонгированным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение. Доза и частота введения варьируются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В целом наиболее продолжительным временем полужизни характеризуются человеческие антитела, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела. Доза и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. В случае профилактических примене-

ний вводят относительно низкую дозу с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают подвергаться лечению в течение всей оставшейся жизни. В случае терапевтических применений иногда требуется введение относительно высокой дозы с относительно короткими интервалами до снижения или прекращения прогрессирования заболевания и до тех пор, пока у пациента не произойдет частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациента можно переводить на профилактический режим.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, представленных в настоящем описании, можно варьировать таким образом, чтобы получать количество действующего вещества, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента при применении указанной композиции и пути введения, но не токсичное для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций, представленных в настоящем описании, или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или продуктов, применяемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, веса тела, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Композицию, представленную в настоящем описании, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из разнообразных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или форма введения должны варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Пути введения антител к TREM-1, представленных в настоящем описании, могут включать внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например инъекцию или инфузию. Понятие "парентеральное введение" в контексте настоящего описания обозначает пути введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, введение путем инъекции, и включает (но не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриоболочечную, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию.

В альтернативном варианте антитела, представленное в настоящем описании, можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный путь или через слизистую оболочку, например, интраназально, орально, вагинально, ректально, подъязычно или местно.

Действующие вещества можно включать в препаративную форму с носителями, которые защищают соединение от быстрого высвобождения, такую как препаративная форма с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие методы получения таких препаративных форм запатентованы или хорошо известны специалистам в данной области (см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, под ред. J.R. Robinson, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, в конкретном варианте осуществления изобретения терапевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно вводить с помощью устройства для осуществления безыгольной гиподермальной инъекции, такого как устройства, описанные в US № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824; или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для применения с использованием антител к TREM-1, представленным в настоящем описании, включают примеры, приведенные в US № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для высвобождения лекарственного препарата с контролируемой скоростью; US № 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения медикаментов через кожу; US № 4447233, в котором описан лекарственный инфузионный насос для доставки медикамента путем инфузии с точной скоростью; US № 4447224, в котором описан имплантируемый инфузионный аппарат с варьлируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; US № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные компартменты; и US № 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства. Содержание указанных патентов включено в настоящее описание в качестве ссылки. Специалистам в данной области известно много других таких имплантатов, систем доставки и модулей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, можно выпускать в форме, обеспечивающей требуемое распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) препятствует прохождению многих высоко гидрофильных соединений. Для того, чтобы обеспечить прохождение терапевтических соединений, представленных в настоящем описании, через ГЭБ (если это необходимо, например, в случае раков головного мозга), их можно включать, например, в липосомы. Методы получения липосом описаны, например, в US № 4522811;

5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно транспортируются в специфические клетки или органы, усиливая тем самым таргетную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, *J. Clin. Pharmacol.*, 29, 1989, с. 685). Примеры таргетирующих фрагментов включают фолат или биотин (см., например, US 5416016 на имя Low и др.); маннозиды (Umezawa и др., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153, 1988, с. 1038); антитела (P.G. Bloeman и др., *FEBS Lett.*, 357, 1995, с. 140; M. Owais и др., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1995, с. 180); рецептор сурфактантного белка А (Briscoe и др., *Am. J. Physiol.*, 1233, 1995, с. 134); p120 (Schreier и др., *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, с. 9090); см. также K. Keinanen, M.L. Laukkanen, *FEBS Lett.*, 346, 1994, с. 123; J.J. Killion, *I.J. Fidler, Immunomethods*, 4, 1994, с. 273.

VIII. Применения и способы.

Антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, и препаративные формы, содержащие такие антитела (например, фармацевтическая композиция, препаративные формы, полинуклеотиды, векторы и клетки) можно применять для лечения воспалительного заболевания (например, путем ингибирования активности TREM-1).

Таким образом, один из объектов настоящего изобретения относится к способам лечения воспалительного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, который включает введение индивидууму в терапевтически эффективной дозе антитела к TREM-1. Примеры воспалительных заболеваний, которые можно лечить с помощью представленных в настоящем описании антител к TREM-1, включают (но не ограничиваясь только ими) воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона (CD), неспецифический язвенный колит (UC), синдром раздраженного кишечника, ревматоидный артрит (RA), псориаз, псориатический артрит, системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, диабет типа I, болезнь Грейвса, рассеянный склероз (MS), аутоиммунный миокардит, болезнь Кавасаки, заболевания коронарной артерии, хроническое обструктивное заболевание легких, интерстициальное заболевание легких, аутоиммунный тиреоидит, склеродерму, системный склероз, остеоартрит, атопический дерматит, витилиго, реакцию "трансплантат-против хозяина", синдром Шегрена, аутоиммунный нефрит, синдром Гудпасчера, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию, аллергию, астму и другие аутоиммунные заболевания, являющиеся результатом острого или хронического воспаления.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1 можно применять для лечения индивидуумов с воспалительным заболеванием кишечника. Воспалительное заболевание кишечника (IBD) представляет собой заболевание, которое может поражать любую часть желудочно-кишечного тракта от рта до ануса, вызывая широкое разнообразие симптомов. IBD вызывает прежде всего абдоминальную боль, диарею (которая может быть кровавой), рвоту или потерю веса, но может вызывать также осложнения вне желудочно-кишечного тракта, такие как кожная сыпь, артрит, воспаление глаза, усталость и потеря концентрации. Пациентов с IBD можно подразделить на два основных класса: пациенты с неспецифическим язвенным колитом (UC) и пациенты с болезнью Крона (CD). CD, как правило, затрагивает подвздошную кишку и ободочную кишку, она может поражать любую область кишечника, но поражение часто является очаговым (пораженные заболеваниями области в виде очагов распространяются по кишечнику). UC всегда затрагивает прямую кишку (т.е. относится к толстой (ободочной) кишке) и поражение является более непрерывным. При CD воспаление является трансмуральным, приводя к абсцессам, фистулам и стриктурам, в то время как при UC воспаление, как правило, ограничивается слизистой оболочкой. Для болезни Крона не существует фармацевтического или хирургического излечения, в то время как некоторых пациентов с UC можно излечивать путем хирургического удаления ободочной кишки. Возможности лечения ограничены контролем симптомов, поддержанием ремиссии и предупреждением рецидива. Эффективность лечения воспалительного заболевания кишечника в клинических условиях можно оценивать по снижению балла CD, рассчитываемого по балльной шкале индекса активности болезни Крона (CAI) на основе лабораторных тестов и анкеты (опросника) качества жизни. В случае животных моделей эффективность оценивают в основном по увеличению веса, а также по индексу активности болезни (DAI), рассчитываемого на основе комбинации данных о консистенции стула, веса тела и присутствия крови в стуле.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1 представленные в настоящем описании, можно применять для лечения индивидуумов с ревматоидным артритом. Ревматоидный артрит (RA) представляет собой системное заболевание, которое поражает почти весь, если не весь, организм и является одной из наиболее часто встречающихся форм артрита. Он характеризуется воспалением сустава, вызывающим боль, ригидность, жар, покраснение и опухание. Такое воспаление вызывается воспалительными клетками, внедряющимися в суставы, и указанные воспалительные клетки высвобождают ферменты, которые могут расщеплять кость и хрящ. В результате этого указанное воспаление может приводить среди прочих физиологических воздействий к серьезному повреждению кости и хряща и к разрушению сустава и серьезной боли. Пораженный сустав может терять свою форму и правильное расположение, что приводит к боли и потере подвижности. В данной области известно несколько животных моделей ревматоидного артрита. Например, в случае модели коллаген-индуцированного артрита (CIA), у мышей развивается воспалительный артрит, напоминающий человеческий ревматоидный артрит.

рит. Поскольку CIA характеризуется иммунологическими и патологическими особенностями, сходными с RA, это делает его пригодной моделью для скрининга потенциальных противовоспалительных соединений для человека. Эффективность при использовании этой модели оценивают по уменьшению опухания суставов.

Эффективность при RA в клинических условиях оценивают по способности снижать симптомы у пациентов, которую оценивают по комбинации опухания суставов, скорости оседания эритроцитов, уровням С-реактивного белка и уровней в плазме таких факторов, как антитела к цитруллинному белку.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, можно применять для лечения индивидуумов с псориазом. Псориаз представляет собой опосредованное Т-клетками воспалительное нарушение кожи, которое может вызывать значительный дискомфорт. Он представляет собой заболевание, которое в настоящее время не поддается излечению и которое поражает людей всех возрастов. Хотя индивидуумы со слабым псориазом часто могут контролировать свое заболевание с помощью агентов для местной обработки, более одного миллиона людей во всем мире нуждаются в обработке ультрафиолетовым светом или в системной иммуносупрессорной терапии. К сожалению, неудобства и риски, связанные с ультрафиолетовым облучением, и токсичность, присущая многим терапиям, ограничивают их продолжительное применение. Кроме того, у пациентов, как правило, наблюдается рецидив псориаза и в некоторых случаях он возникает вскоре после прекращения иммуносупрессорной терапии. Разработанная в последние годы модель псориаза основана на переносе CD4⁺-Т-клеток, она имитирует многие аспекты человеческого псориаза и поэтому ее можно применять для идентификации соединений, пригодных для лечения псориаза (Davenport и др., *Internat Immunopharmacol.*, 2, 2002, с. 653-672). Эффективность при применении этой модели оценивают с использованием балльной системы по уменьшению кожной патологии. Аналогично этому, эффективность для пациентов оценивают по уменьшению кожной патологии.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела к TREM-1 можно применять для лечения индивидуумов с псориатическим артритом. Псориатический артрит (РА) является типом воспалительного артрита, который возникает в субпопуляции пациентов с псориазом. У этих пациентов кожная патология/симптомы сопровождаются опуханием суставов, сходным с опуханием, наблюдающимся при ревматоидном артрите. Он отличается наличием неоднородных выпуклых покрасневших областей кожного воспаления, характеризующихся шелушением. Псориаз часто поражает сгибы локтей и колен, кожу головы, пупок и области вокруг гениталий и ануса. Примерно у 10% пациентов с псориазом развивается также ассоциированное воспаление суставов.

С точки зрения настоящего описания профилактические, паллиативные, симптоматические и/или радикальное лечение могут рассматриваться как отдельные объекты изобретения. Антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить парентерально, например, внутривенно, например, внутримышечно, например, подкожно. В альтернативном варианте антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить непарентеральным путем, например, перорально или местно. Антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить в профилактических целях. Антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить в терапевтических целях (по требованию).

Представленные ниже примеры даны с целью иллюстрации изобретения, но не для ограничения его объема. Содержание всех процитированных в настоящей заявке документов, специально включено в нее в качестве ссылки.

Примеры

Пример 1. Анализ кинетических характеристик взаимодействия вариантов антитела 318 с TREM-1 человека и обезьян циномоглус, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Определяли кинетические характеристики связывания вариантов mAb 0318 с человеческим TREM-1-Fc (hTREM-1) и TREM-1-Fc обезьян циномоглус (cTREM-1). Изучение связывания осуществляли на анализаторе ProteOn (фирма BioRad), с помощью которого измеряли молекулярные взаимодействия в реальном времени на основе поверхностного плазмонного резонанса. Эксперименты проводили при 25°C и образцы хранили при 15°C в компартменте для образцов. Сигнал (RU, единицы ответа), измеряемый с помощью ProteOn, находится в прямой корреляции с массой на поверхностях индивидуальных сенсорных чипов в шести параллельных проточных ячейках. Моноклональное антитело к человеческому Fc или поликлональное антитело к мышинному Fc из наборов для захвата человеческого или мышинного Fc фирмы Biacore иммобилизовали в горизонтальном направлении на проточных ячейках сенсорного чипа GLM согласно инструкциям производителя. Конечный уровень иммобилизации захватывающего антитела соответствовал примерно 2600-6000 RU в каждом эксперименте. Захват очищенных моноклональных мышинных или рекомбинантно экспрессируемых антител к hTREM-1 осуществляли путем разведения антител до концентрации 5-10 нМ в подвижном буфере (10 мМ Hepes, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4), после чего инъецировали в вертикальном направлении со скоростью 30 мкл/мин в течение 60 с, в результате чего создавали промежуточные референс-пятна по соседству со всеми проточными ячейками, в которых было иммобилизовано только антитело к Fc. Это, как правило, приводило к конечным уровням захвата тестируемых антител, соответствующих примерно

100-300 RU и величинам R_{max} аналита 30-90 RU. Связывание белков hTREM-1 или cTREM-1 осуществляли путем инъекции аналита (антиген) во все проточные ячейки в горизонтальном направлении для обеспечения возможности сравнительного анализа связывания различных захваченных антител с TREM-1 относительно связывания с промежуточным референс-пятном. Белки hTREM-1 или cTREM-1 серийно разводили в соотношении 1:3 в подвижном буфере, охватывая диапазон концентраций 1,2-100 нМ, инъецировали со скоростью 100 мкл/мин в течение 250 с и давали возможность диссоциировать в течение 600 с. Поверхность GLM регенерировали после каждого цикла инъекции аналита посредством двух инъекций в течение 18 с 10 мМ глицина, pH 1,7 и 50 мМ NaOH со скоростью 100 мкл/мин. С помощью этой стадии регенерации удаляли антитело к TREM-1 и любой связанный белок TREM-1 с поверхности с иммобилизованным захватывающим антителом и обеспечивали возможность последующего связывания следующей пары образцов, предназначенных для анализа взаимодействия. Процедура регенерации не приводила к удалению непосредственно иммобилизованного захватывающего антитела к Fc с поверхности чипа.

Аффинности связывания антител с антигеном количественно оценивали путем определения константы равновесия реакции диссоциации (K_D), которую определяли путем измерения кинетических характеристик формирования комплекса и его диссоциации. Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, такие как k_a (скорость ассоциации) и k_d (скорость диссоциации), получали путем подгонки данных к модели связывания Лэнгмюра по типу 1:1 с использованием для оценки программного обеспечения ProteOn, предназначенного для анализа данных. Коэффициент K_D связан с k_a и k_d уравнением $K_D = k_d/k_a$.

Перед осуществлением анализа данных кривые связывания обрабатывали с использованием двойного контроля (вычитание сигналов от референс-поверхности, а также уровней, полученных при инъекции чистого буфера на захваченные антитела к TREM-1). Это позволяло вносить коррекцию на инструментальный шум, сдвиг и дрейф массива в процессе инъекций образца.

Как продемонстрировано на фиг. 1A и 1B, установлено, что все варианты mAb 0318 (а именно 318-IgG1.1f, 318-IgG1.3f, 318-IgG4-Aba и 318-IgG1-Aba) обладали аффинностью к человеческому TREM-1-Fc, сходной с аффинностью mAb 0318-IgG4. Вариант 0318-IgG1.3f связывался также с TREM-1 обезьян циномогус, хотя и с несколько более низкой аффинностью по сравнению с аффинностью к человеческому TREM-1 (см. фиг. 1A)

Пример 2. Анализ интернализации mAb 0318-IgG1.3f после связывания с рецептором TREM-1.

Вариант антитела mAb 0318-IgG1.3f тестировали в отношении его интернализации в первичных человеческих моноцитах с помощью как лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (данные не представлены), так и визуализирующего проточного цитометрического анализа с использованием системы Amnis ImageStream®. Как продемонстрировано на фиг. 2A, в момент времени 0 ч TREM-1 экспрессировался в основном на поверхности моноцитов. Однако через 24 ч после связывания антитела значительный процент (~36%) рецептора TREM-1 (по результатам окрашивания с помощью 0318-IgG1.3f) был интернализован, это позволяет предположить, что после связывания антитела mAb 0318-IgG1.3f весь комплекс антитело-рецептор интернализировался в клетку.

Затем для определения "судьбы" рецептора TREM-1 после его интернализации применяли антитело TREM26 (каталожный номер 314902, фирма Biolegend; см. US № 20150274825, параграф [0005]) для сравнения. Антитело TREM26 не конкурирует с вариантами антитела 0318, представленными в настоящем описании. Как продемонстрировано на фиг. 2B, в момент времени 20 ч наблюдалось значительное снижение экспрессии TREM26⁺ (~51%) по сравнению с моментом времени 0 ч. Было выявлено также значительное уменьшение (4-кратное) уровня MFI (средний индекс флуоресценции) TREM26⁺ в момент времени 20 ч (после обработки mAb 0318-IgG1.3f), это позволяет предположить, что TREM-1 расщеплялся после интернализации. Указанное уменьшение экспрессии рецептора TREM-1 после воздействия антитела являлось обратимым, однако, это имело место после удаления антитела (данные не представлены).

Пример 3. Анализ эффективности блокирования активации TREM-1 вариантами mAb 0318 с помощью репортерного анализа с использованием клеток BWZ/hTREM-1.

Способность вариантов антитела mAb 0318 к TREM-1 ингибировать передачу сигнала человеческого TREM-1 определяли путем анализа с использованием линии клеток BWZ.36/hTREM-1DAP12:NfAT-LacZ (в настоящем описании обозначена также как "репортерная клетка BWZ/hTREM-1"), описанного, например, в US № 9550830 B2 и публикации международной заявки на патент WO 2016/009086 A1. В целом метод состоял в следующем: примерно 40000 hTREM-1/BWZ.36 клеток/лунку высевали на черный 96-луночный планшет с прозрачным плоским дном в присутствии 75 нг/мл PGLYRP1 (SEQ ID NO: 8) с 2,5 мкг/мл PGN-ECndi (каталожный номер tlr1-kipgn, фирма Invivogen, Сан-Диего, шт. Калифорния, США) для обеспечения положительного сигнала с интенсивностью, составляющей половину от максимальной, или в альтернативном варианте в присутствии субмаксимального уровня (1 мкг/мл) адсорбированного на пластике моноклонального антитела к TREM-1 (каталожный номер MAB1278, фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) для обеспечения положительного сигнала.

При проведении анализа варианты mAb 0318 (т.е. 0318-IgG1.3f, 0318-IgG1.1f, 0318-IgG1-Aba; и 0318-IgG4-Aba) титровали, начиная с концентрации 10 мкг/мл, используя 5 серийных 2-кратных разведе-

ний. Анализируемый образец инкубировали в течение ночи при 37°C, затем проявляли с использованием Beta Glo (каталожный номер E4740, фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин, США) согласно протоколу для Beta Glo и регистрировали люминесценцию. По результатам строили график зависимости интенсивности люминесценции Beta Glo (в относительных единицах) от концентрации антитела. На каждом планшете для анализа тестировали используемый в качестве отрицательного контроля не обладающий нейтрализующей способностью mIgG1 (каталожный номер MAB002, фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) и используемое в качестве положительного контроля обладающее нейтрализующей способностью поликлональное козье антитело к hPGLYRP1 (каталожный номер AF2590, фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США). В качестве положительного контроля использовали также антитело MAB1278 (каталожный номер MAB1278, фирма R&D Systems; см. US № 20150274825, параграф [0005]), известный агонист передачи сигнала TREM-1 (см. прямоугольную вставку).

Как продемонстрировано на фиг. 3, все варианты mAb 0318 являлись сильными ингибиторами передачи сигнала человеческого TREM-1, что было описано ранее для антитела mAb 0318 IgG4 в публикации международной заявки на патент WO 2016/009086 A1.

Пример 4. Анализ *in vitro* эффективности вариантов антитела mAb 0318 в отношении ингибирования опосредуемого TREM-1 производства провоспалительных цитокинов различными первичными человеческими клетками.

Для дополнительной оценки антагонистических свойств вариантов антитела mAb 0318 к TREM-1 анализировали их эффективность в отношении блокирования высвобождения различных провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-6 или IL-8) активированными человеческими первичными клетками. Первичные моноциты, нейтрофилы и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из человеческой цельной крови и стимулировали иммобилизованным на планшете PGRP1 и растворимым пептидогликаном (PGN-ECndss; форма пептидогликана, не обладающая TLR2-активностью).

Как продемонстрировано на фиг. 4, все варианты mAb 0318 (т.е. IgG1.3f, IgG1.1f, IgG1-Aba и IgG4-Aba) оказались эффективными в отношении ингибирования (величины IC₅₀ находились в диапазоне ~10-20 пМ) опосредуемого TREM-1 высвобождения TNF- α из PBMC и моноцитов. Эффективность указанных вариантов mAb 0318 была сходной с эффективностью антитела mAb 0318-IgG4. Антитело mAb 0318-IgG1.3f обладало эффективностью также и в отношении ингибирования производства IL-6 (величина IC₅₀ ~32 пМ). В случае нейтрофилов вариант mAb 0318-IgG1.3f обладал более высокими по сравнению с антителом mAb 0318-IgG4 характеристиками в отношении блокирования опосредуемого TREM-1 производства IL-8 нейтрофилами (см. фиг. 4).

Для дополнительной демонстрации антагонистических свойств вариантов антитела mAb 0318 к TREM-1 применяли также анализ совместной культуры моноцитов-нейтрофилов. Ассоциированный с нейтрофилами PGRP1 при совместном культивировании с моноцитами может связываться с рецепторами TREM-1, приводя к производству моноцитами TNF- α . Как продемонстрировано на фиг. 4, все варианты антитела mAb 0318 эффективно блокировали указанную эндогенную активацию (величины IC₅₀ находились в диапазоне 19-44 пМ). Сходные результаты были получены для цельной крови с осажденными RBC (см. фиг. 4).

Пример 5. Анализ *in vitro* эффективности mAb 0318-IgG1.3f в отношении блокирования производства IL-8 в стимулированной цельной крови.

Одной из главных проблем при разработке анализа фармакодинамики в цельной крови (ФД) для оценки антагонистических свойств вариантов антитела к TREM-1 является высокий исходный уровень, обусловленный PGN-стимуляцией. Для облегчения решения этой проблемы цельную кровь стимулировали заранее сформированным комплексом PGRP1+PGN в присутствии ингибитора NOD2 (для того, чтобы блокировать исходные цитокины, продуцированные в результате PGN-стимуляции NOD2). Уровни IL-8 измеряли с помощью стандартного фармакодинамического анализа связывания лиганда (HTRF®) (фиг. 5A) или анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) (фиг. 5B).

Как продемонстрировано на фиг. 5A и 5B, антитело 0318-IgG1.3f эффективно блокировало опосредуемое TREM-1 производство IL-8, что характеризовалось процентом ингибирования, составлявшим 60-90% (см. фиг. 5A). Измеренные величины IC₅₀ (среднее значение 12 пМ при использовании HTRF и 19,6 пМ при использовании ICS) оказались сходными с величинами, полученными с применением других функциональных анализов (см., например, пример 4).

Пример 6. Анализ *in vitro* эффективности mAb 0318-IgG1.3f в отношении блокирования экспрессии мРНК различных медиаторов воспаления в стимулированной цельной крови.

Для дополнительной демонстрации антагонистических свойств mAb 0318-IgG1.3f измеряли уровни экспрессии некоторых медиаторов воспаления (т.е. хитиназа-3-подобного белка 1 ("CHI3L1"), IL1 β и IL6) с помощью ПЦР в реальном времени (кПЦР). В целом метод состоял в следующем: собранную в пробирки с EDTA человеческую цельную кровь трех здоровых добровольцев (доноры № 126, 290 и 322) стимулировали заранее включенными в комплекс hPGRP1 (50 мкг/мл) и PGN-ECndss (10 мкг/мл) (фирма Invivogen, каталожный номер tlr1-kssp gn) в течение ночи в присутствии mAb 0318-IgG1.3f в различных

концентрациях (0-1нМ). После стимуляции плазму удаляли и замораживали для измерения уровней цитокинов. Из образцов выделяли мРНК с использованием набора MagMax-96 Blood Isolation (фирма ThermoFisher, каталожный номер AM1837) согласно протоколу производителя. Затем выделенную мРНК превращали в кДНК с использованием мастер-смеси Superscript VILO (фирма Thermo Fisher, 11755250). После этого осуществляли qPCR с применением следующих зондов: HPRT1 (Hs99999909_ml) (фирма Thermo Fisher, 4351370), CHI3L1 (Hs01072228_ml) (фирма Thermo Fisher, 4331182), IL1 β (Hs00174097_ml) (фирма Thermo Fisher, 4331182) и IL6 (Hs00985639_ml) (фирма Thermo Fisher, 4331182) и универсальной мастер-смеси TaqMan Fast (2 \times) (фирма Thermo Fisher, 4366072). Уровни генной экспрессии стандартизовали относительно уровня зонда HPRT1 и получали величины ААСТ. Затем по результатам строили график и определяли величины IC₅₀.

Как продемонстрировано на фиг. 6А-6В, и в соответствии с результатами, представленными в приведенных выше примерах, mAb 0318-IgG1.3f обладало способностью ингибировать опосредуемую TREM-1 экспрессию различных медиаторов воспаления в человеческой цельной крови. Установлено, что ингибирование зависело от дозы. Величины IC₅₀ приведены ниже в табл. 1.

В совокупности, представленные выше результаты демонстрируют, что варианты антитела mAb 0318, представленные в настоящем описании, обладают антагонистическим действием и могут эффективно блокировать опосредуемое TREM-1 производство провоспалительных цитокинов различными человеческими клетками.

Таблица 1

Тип клеток	Провоспалительный медиатор	Стимул	mAb 0318-IgG1.3f IC ₅₀ (нМ)
цельная кровь	РНК CHI3L1	растворимый PGRP +	4,58 \pm 5,60 (N=3)
	РНК IL1b	растворимый PGN-Ecndss	11,15 \pm 16,01 (N=3)
	РНК IL6		97,66 \pm 125,63 (N=3)

Пример 7. Вязкость вариантов mAb 0318.

В образце заменяли буфер и осуществляли диализ с использованием выбранного состава (20мМ гистидин, 150 мМ сахараза, 25 мМ аргинин, 50 мМ хлорид натрия, рН 6,0), после чего концентрировали с использованием центрифужных фильтров фирмы Amicon Ultra с отсечкой по молекулярной массе. Агрегационное состояние образцов оценивали с помощью гель-фильтрации для контроля возможных изменений мономерности, если они имели место, после концентрирования. Зависимость вязкости от концентрации определяли с помощью вискозиметра для раствора RheoSense m-VROC, осуществляя для каждой анализируемой концентрации измерение возрастающих сдвиговых усилий по 3 точкам. Концентрацию определяли на основе измерения абсорбции при 280 нм с помощью прибора nanoDrop с применением серийных разведений и экстраполяции.

Как продемонстрировано на фиг. 7, оба варианта 318-IgG1.1f и 318-IgG1.3f обладали сходным профилем вязкости. При концентрации примерно 130 мг/мл вариант 0318-IgG1.3f имел величину вязкости примерно 9 сП. Такой профиль вязкости близок к профилю, определенному ранее для mAb 0318-IgG4 (см. публикацию международной заявки на патент WO 2016/009086).

Пример 8. Иммуногенный потенциал вариантов mAb 0318.

Как продемонстрировано на фиг. 8 и в табл. 2 (ниже), варианты 318-IgG1.1f и 318-IgG1.3f характеризовались риском иммуногенности для больных людей от низкого до среднего. Только примерно 22-30% доноров давали иммуногенные ответы (которые оценивали по пролиферации *in vitro* CD4⁺ Т-клеток) на указанные антитела. Иммуногенность вариантов 0318-IgG1-Aba и 0318-IgG4-Aba составляла 10% и 42.5% соответственно (см. табл. 2 (ниже)). В отличие от этого, вариант mAb 0318-IgG4 оказался намного более иммуногенным (55%) для больных людей. KLN (гемоцианин лимфы улитки) и VL6 (МАТ к IL-21R), которые применяли в качестве положительных контролей, обладали высокой иммуногенностью для больных людей (100 и 40% соответственно).

Таблица 2

Анализ	Когорта	Вариант 0318	конц (мг/мл)	Клетка-хозяин	ЕУ/мг	% мономера	Конц в анализе (мкг/мл)	% иммуногенности
РВМС	40	IgG4	161	UCOE CHO	<0,001	97,9	150	55,0
РВМС	40	IgG1-Aba	145	UCOE CHO	<0,001	97,3	150	10,0
РВМС	40	IgG1.1f	170	UCOE CHO	<0,006	98,6	150	22,5
РВМС	40	IgG4-Aba	5	НЕК	<0,02	98,9	150	42,5
РВМС	40	IgG1.3f	4,6	НЕК	<0,02	99,5	150	30,0

Пример 9. Анализ связывания вариантов mAb 0318 с FcRn методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Для определения того, обладают ли различные варианты mAb 0318 способностью связываться с

FcRn, осуществляли иммобилизацию рецепторов FcRn (мышей, человека и обезьян циномоглус) на био-сенсорном чипе CM5 BIAcore (фирма GE Healthcare Bioscience, Уппсала, Швеция) посредством аминного сочетания до достижения уровня, соответствующего 400 единицам ответа (RU). Анализ проводили при комнатной температуре с использованием ЗФР, 0,05% Tween-20™, pH 6,0 (фирма GE Healthcare Bioscience) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Различные варианты mAb 0318 (200нМ) инъецировали со скоростью потока 50 мкл/мин при комнатной температуре и pH 6,0. Время ассоциации составляло 180 с, фаза диссоциации (также при pH 6,0) занимала 360 с. Регенерацию поверхности чипа до возврата к исходному уровню осуществляли путем кратковременной инъекции 50 мМ Трис, pH 8,0 и 150 мМ NaCl. Анализ SPR-данных проводили путем сравнения высоты сигнала биологического ответа через 180 с после инъекции и через 300 с после инъекции. Соответствующие параметры представляли собой максимальный уровень в RU (RU max) (через 180 с после инъекции) и поздний уровень стабильности (через 300 с после завершения инъекции).

Как продемонстрировано на фиг. 9А и 9Б, все варианты антитела mAb 0318 (IgG1-Aba mod, IgG4-Aba mod, IgG1.1f и IgG1.3f) обладали способностью связываться с FcRn человека, мышей и обезьян циномоглус в зависимости от pH. Это имело место также и для антитела mAb 0318 (IgG4).

Пример 10. Анализ связывания вариантов mAb 0318 с одним или несколькими FcγR.

Как указано выше, введение *in vivo* антител к определенным рецепторам на поверхности иммунных клеток может индуцировать высвобождение цитокинов, что может приводить к индукции общего и токсического клинического осложнения, известного как синдром высвобождения цитокинов (CRS). Из-за опасения, что участие FcγR в результате перекрестного сшивания может приводить к возможному проявлению агонистической активности TREM-1, антитело mAb 0318-IgG4 преобразовывали в один из вариантов форматов, представленных в настоящем описании (т.е. IgG1.1f, IgG1.3f, IgG1-Aba или IgG4-Aba). Затем оценивали способность вариантов антитела 0318 к связыванию с различными FcγR.

Как продемонстрировано на фиг. 10А и 10Б, варианты 318-IgG1.1f и 318-IgG1.3f характеризовались минимальным связыванием со всеми FcγR (т.е. FcγRI (CD64), FcγRIIA (варианты CD32a-H131 и CD32a-R131), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIA (вариант CD16a-V158) и FcγRIIB (вариант CD16b-NA2)). Варианты 318-IgG1-Aba и 318-IgG4-Aba не связывались с FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA и FcγRIIB, но связывались с FcγRI. В отличие от этого, mAb 0318 (IgG4) характеризовалось значительным уровнем связывания со всеми FcγR.

Пример 11. Анализ индукции провоспалительных цитокинов вариантами mAb 0318.

Для дальнейшего определения того, приводит ли обработка *in vivo* вариантами mAb 0318 к риску возникновения синдрома высвобождения цитокинов, собирали цельную кровь у 8 доноров и выделяли моноциты. Затем моноцитам давали дифференцироваться в незрелые дендритные клетки, высевая моноциты (4×10^6 клеток/лунку) и культивируя их в среде для дифференцировки, содержащей IL-4 и GM-CSF (100 нг/мл). Примерно через 2-3 дня после посева примерно половину среды для дифференцировки заменяли свежей средой. В день 7 клетки собирали и оценивали эффективность дифференцировки путем анализа экспрессии CD14 на клетках с помощью проточного цитометра. Затем незрелые дендритные клетки высевали на плоскостонный планшет ($0,8 \times 10^5$ клеток/лунку) и в соответствующие лунки добавляли варианты mAb 0318 (содержащие или не содержащие CHO-CD32a). Незрелые дендритные клетки, стимулированные PGRP+PGN, использовали в качестве положительного контроля. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день собирали супернатанты из лунок и оценивали количество продуцированного TNF-α, IL-6 и IL-12 с помощью ELISA.

Результаты, полученные для репрезентативных доноров, представлены на фиг. 11А-11И. Добавление различных вариантов mAb 0318 (0318-IgG1.1f, 0318-IgG1.3f и 0318-IgG1.1 Aba) приводило к минимальному производству IL-6 (фиг. 11А, 11Б и 11В), TNF-α (фиг. 11Г, 11Д и 11Е) и IL-12 (фиг. 11Ж, 11З и 11К) незрелыми дендритными клетками. Эти результаты наряду с полученными в примере 9, свидетельствуют о том, что антитела к TREM-1, представленные в настоящем описании, характеризуются низким риском индукции синдрома высвобождения цитокинов при введении пациентам *in vivo*.

Пример 12. Дополнительные характеристики вариантов mAb 0318.

Биофизические характеристики варианта 0318-IgG1.3f приведены ниже в табл. 3.

Биофизические характеристики антитела к TREM-1 0318-IgG1.3f

Свойство	Метод	Результат
Идентичность	ЖХ-МС	Подтверждена интактная масса
	Пептидное картирование методом ЖХ-МС/МС	Последовательность подтверждена с помощью пептидной карты с использованием Lys-C (выход 95,4%; степень гликозилирования 99,7%)
Чистота/гомогенность	SEC	мономер 96,3%, HMW 3,6%
	SEC-MALS	Основной пик - 95% мономера и является гомогенным (145 кДа)
	ЖХ-МС	G0F (23,3%), G1F (51,3%), G2F (17,3%), SG2F (2,1%), S2G2F (1,0%)
	Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF)	Основной пик pI = 8,75 (55%); кислотный варианты = 29,5% и основные варианты = 15,5%
Аффинность	SPR (Biacore)	В восстанавливающих условиях: 2 основные полосы ~50 кДа и 25 кДа
		В невосстанавливающих условиях: основная полоса ~150 кДа с минорными фрагментами ~98 кДа, 75 кДа, 50 кДа, 25 кДа (артефакты, обусловленные условиями ДСН-разгонки)
Термостабильность	DSC	huTREM1: $K_D = 0,91 \text{ нМ}$; $k_{on} = 1,4 \text{ E}+06 \text{ (1/Мс)}$; $k_{off} = 1,3 \text{ E}-3 \text{ (1/с)}$
		CynoTREM1: $K_D = 3,4 \text{ нМ}$; $k_{on} = 4,0 \text{ E}+05 \text{ (1/Мс)}$; $k_{off} = 1,4 \text{ E}-3 \text{ (1/с)}$
Взаимодействие Fc γ R/FcRn	SPR (Biacore)	$T_{m1} = 66,2^\circ\text{C}$; $T_{m2} = 78,4^\circ\text{C}$; $T_{m3} = 83,2^\circ\text{C}$ Обратимость при 77°C составляет 24%
		Продемонстрирована пониженная способность к связыванию со всеми Fc γ R Ожидаемое pH-зависимое связывание FcRn сопоставимо со связыванием МАТ IgG1 дикого типа

Для клинических разработок биофизические характеристики варианта mAb 0318-IgG1.3f являются предпочтительными. Идентичность антитела была подтверждена с помощью масс-спектрометрического анализа (анализ интактной массы и пептидное картирование). По данным анализа методом гель-фильтрации >96% антитела находилось в форме мономера. Было подтверждено наличие одного сайта N-гликозилирования на N301 тяжелой цепи, профиль гликанов соответствовал профилю гликанов экспрессируемых CHO моноклональных антител (G0F, G1F и G2F). Термостабильность ($T_{m1}=66,2^\circ\text{C}$; $T_{m2}=78,4^\circ\text{C}$; $T_{m3}=83,2^\circ\text{C}$) и обратимость при нагреве (24% при 77°C) mAb 0318-IgG1.3f находились в диапазоне, характерном для типичного человеческого моноклонального антитела IgG1.3.

Характеристики стабильности варианта mAb 0318-IgG1.3f приведены в табл. 4 (ниже).

Стабильность антитела к TREM-1 0318-IgG1.3f

Свойство	Метод(ы)	Результаты
Замораживание/оттаивание (2 ч при -80°C, 4 ч при RT × 3)	УФ, SEC, DLS, iCIEF	Не выявлено риска для стабильности при замораживании/оттаивании
Профиль растворимость/концентрация	УФ, SEC	>150 мг/мл в буфере для композиции (20мМ гистидин, 150мМ сахараза, 50мМ хлорид натрия, 25мМ аргинин, pH 6,0)
Выбор значения pH, обеспечивающего конформационную и коллоидную стабильность	Optim2 (температуры плавления и начала агрегации T _m и Tagg)	Оптимальная конформационная стабильность при pH 6-8 Оптимальная коллоидная стабильность при pH 5-6
Выбор буфера и эксципиевтов	Optim2 (температуры плавления и начала агрегации T _m и Tagg)	Стабилизаторы: сахараза, сорбит, аргинин (высокая концентрация), глицерин
Ускоренный тест на стабильность 150 мг/мл 12 недель при 4°C, 25°C и 40°C в буфере для композиции (20мМ гистидин, 150мМ сахараза, 50мМ хлорид натрия, 25мМ аргинин, pH 6,0)	SEC, sIEF, HIC, ЖХ-МС/МС (пептидное картирование), ЖХ/МС (интактная масса), 2D-ЖХ/МС (фрагменты), Biacore, биоанализ, УФ-Vis, DLS	12 недель при 40°C: увеличение содержания HMW на 1,2%/месяц увеличение содержания LMW на 2,4%/месяц 12 недель при 40°C: увеличение Rh и Pd 12 недель при 40°C: увеличение содержания кислотных вариантов на 11%/месяц 12 недель при 40°C: дезаминирование VSNK на 3%/месяц
Оценка вязкости	Определение профиля концентрация-вязкость	Вязкость раствора достигает 9 сП при ~130 мг/мл, предсказанная вязкость 12 сП при 150 мг/мл

Не было выявлено связанных с физический стабильностью проблем при проведении опыта на стресс при замораживании-оттаивании (3 цикла) при концентрации 150 мг/мл в буфере описанного состава (20 мМ гистидин, 150 мМ сахараза, 50 мМ хлорид натрия, 25 мМ аргинин, pH 6,0). Тесты на ускоренную деградацию рассматриваемой композиции в концентрации 150 мг/мл проводили при 4, 25 и 40°C (в течение периода времени вплоть до 3 месяцев). Химические модификации CDR оставались на низком уровне при всех температурных условиях и не влияли на активность по данным анализа методом SPR. Дезаминирование VSNK было ниже ожидаемого уровня по сравнению с другими моноклональными антителами с каркасом IgG1.3f (увеличение на 3%/месяц в условиях хранения при 40°C), изменения зависели от времени и температуры. Все другие химические модификации (окисление, дезаминирование, изомеризация) также оставались на низком уровне при наблюдении в процессе проведения тестов на стабильность. Следует отметить, что в условиях хранения при 40°C выявлено образование как HMW-вариантов, так и LMW-вариантов (со скоростью 1,2%/месяц и 2,4%/месяц соответственно). Выявленные изменения зависели от времени и температуры, так количество HMW возрастало на 0,25%/месяц, а количество LMW оставалось неизменным в условиях хранения при 4°C в течение периода исследования. Низкое образование LMW в условиях хранения при 40°C классифицировали на основе измерений методом 2D-ЖХ/МС и точных измерений массы с высоким разрешением как результат накопления видов с утраченным 1 Fab, а также Fab-плечом, предположительно в консервативной последовательности в верхней шарнирной области.

Пример 13. Изучение ФК/ТК/ФД варианта mAb 0318-IgG1.3f на обезьянах цинолмолгус.

Проводили изучение фармакокинетических (ФК), токсикокинетических (ТК) и фармакодинамических (ФД) характеристик антитела к TREM-1 0318-IgG1.3f при его однократном введении обезьянам цинолмолгус. Некоторым животным (n=3) вводили внутривенно антитело 0318-IgG1.3f в дозе 2 мг/кг. Другим животным вводили подкожно антитело 0318-IgG1.3f в одной из следующих доз: (I) 0 мг/кг (т.е. контроль) (n=4), (II) 0,1 мг/кг (n=4), (III) 0,5 мг/кг (n=4), (IV) 2 мг/кг (n=3) или (V) 10 мг/кг (n=4). После введения антитела анализировали в заранее определенные моменты времени фармакокинетические характеристики, наличие антител к лекарственному средству (ADA), оккупацию рецептора TREM-1 (RO) и фармакодинамические ответы *ex vivo*.

Фармакокинетические характеристики (ФК).

Для оценки фармакокинетических характеристик определяли концентрацию антитела 0318-IgG1.3f

в сыворотке животных с помощью анализа связывания лиганда с использованием биотинилированного рекомбинантного белка TREM-1 в качестве захватывающего реагента и поступающего в продажу поликлонального козьего антитела к TREM-1 в качестве реагента для обнаружения.

Как продемонстрировано на фиг. 12, установлено, что фармакокинетические характеристики антитела 0318-IgG1.3f были нелинейными в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мг/кг, главным образом вследствие мишень-опосредованного клиренса (т.е. интернализации и деградации антитела после связывания с рецептором TREM-1; см. пример 2).

Полученные с помощью некомпартментного анализа ФК-параметры представлены в табл. 5 (внутривенное введение) и 6 (подкожное введение). В целом результаты заключались в следующем: 100-кратное увеличение дозы приводило к 830-кратному увеличению экспозиций в сыворотке (AUC) (см. табл. 6). Клиренс в организме обезьян после введения IV дозы 2 мг/кг составлял $0,1 \pm 0,02$ мл/ч/кг и был сходным с клиренсом других МАт в виде IgG1 (см. табл. 4). Величина Vss при 36 ± 5 мл/кг была сходной с объемом плазмы, что свидетельствовало об ограниченном экстраваскулярном распределении. Время полужизни антитела 0318-IgG1.3f возрастало с 2 дней при введении дозы 0,1 мг/кг до 10 дней при введении доз 2 и 10 мг/кг (подкожное введение однократной дозы) (см. табл. 6). Биодоступность антитела 0318-IgG1.3f после подкожного введения (2 мг/кг) была высокой и составляла 84%.

Таблица 5

ФК-параметры mAb 0318-IgG1.3f после IV-введения однократной дозы обезьянам циномольтус

ФК-параметры mAb 0318-IgG1.3f после IV-введения обезьянам циномольтус	
Доза (мг/кг)	2
N	3
V _{ss} (мл/кг)	36 ± 5
CL (мл/ч/кг)	$0,1 \pm 0,02$
T _{1/2} (дни)	10 ± 2
AUC _{last} (мкМ×ч)	116 ± 20
ADA-позитивные/все проанализированные	3/3 (1/3)*

* Количество обезьян, у которых выявлены персистентные ADA, среди всех проанализированных.

Таблица 6

ФК-параметры mAb 0318-IgG1.3f после SC-введения однократной дозы обезьянам циномольтус

ФК-параметры mAb 0318-IgG1.3f после SC -введения обезьянам циномольтус				
Доза (мг/кг)	0,1	0,5	2	10
N	4	4	3	4
C _{max} (нМ)	13 ± 4	50 ± 3	189 ± 22	1419 ± 93
T _{max} (ч)	24	48	168 ± 96	84 ± 24
AUC _{last} (мкМ×ч)	$1 \pm 0,2$	15 ± 1	94 ± 13	649 ± 64
T _{1/2} (дни)	$2 \pm 0,4$	4 ± 2	10 ± 5	10 ± 3
Биодоступность после SC-введения			84%	
ADA-позитивные/все проанализированные	3/4 (2/4)*	4/4 (2/4)*	3/3 (2/3)*	3/4 (1/4)*

* Количество обезьян, у которых выявлены персистентные ADA, среди всех проанализированных.

Антитела к лекарственному средству (ADA).

В то время как ADA были обнаружены в сыворотке большинства обезьян (у 16 из 18) после введения однократной дозы (независимо от пути введения), у большинства ADA-позитивных животных не было выявлено негативного влияния на экспозицию антитела 0318-IgG1.3f и оккупацию рецептора TREM-1 (RO) (см. табл. 4 и 5). Ускоренное снижение конечной экспозиции антитела 0318-IgG1.3f, которое сопровождалось формированием ADA, было выявлено только у двух обезьян (у одной в группе, обработанной дозой 0,1 мг/кг, в день 7 и у одной в группе, обработанной дозой 0,5 мг/кг, в день 21). Вследствие того, что ADA повлияли на экспозицию у этих двух обезьян на конечной фазе, соответствующие данные были исключены из ФК-анализа.

Оккупация рецептора TREM-1 (RO) и общие уровни рецептора TREM-1.

Затем оценивали оккупацию рецепторов TREM-1, экспрессируемых на моноцитах и гранулоцитах периферической крови. Как продемонстрировано на фиг. 15А и 15Б, для всех протестированных доз проценты оккупированных рецепторов TREM-1 (т.е. связанных с антителом к TREM-1) на моноцитах и гранулоцитах были сходными. Кроме того, оказалось, что продолжительность оккупации рецептора зависела от введенной животным дозы антитела 0318-IgG1.3f. В случае дозы 0,5 мг/кг уровень RO, составлявший $\geq 85\%$, наблюдался в течение периода времени вплоть до 2 недель после введения антитела. В отличие от этого в случае доз 2 и 10 мг/кг уровень оккупированных рецепторов TREM-1, составлявший $\geq 85\%$, сохранялся в течение по меньшей мере 1 месяца после введения.

После введения доз антитела 0318-IgG1.3f общие уровни рецептора TREM-1 снижались как на мо-

ноцитах, так и на гранулоцитах (см. фиг. 14А и 14Б). Как описано ранее, такое уменьшение обусловлено главным образом повышением оборачиваемости рецептора после связывания с антителом. Снижение экспрессии рецептора TREM-1 на поверхности было обратимым и продолжительность утраты рецептора на поверхности коррелировала с продолжительностью оккупации рецептора по меньшей мере при изученных уровнях доз.

Установлено, что уровни растворимого TREM-1 (sTREM-1) повышались в 10-50 раз после введения однократной дозы варианта mAb 0318 mAb-IgG1.3f во всех протестированных обработанных дозой группах (данные не представлены). Осталось невыясненным, связано ли повышение уровней sTREM-1 с введением антитела к TREM-1 или с общими условиями содержания животных в процессе исследования. В любом случае, поскольку концентрации лекарственного средства намного превышали (>1000 раз) уровни sTREM-1, нельзя предположить, что растворимая мишень оказывала влияние на связывание варианта mAb 0318 mAb-IgG1.3f с TREM-1 на клеточной поверхности.

Пример 14. Изучение ФК/ТК/ФД варианта mAb 0318-IgG1.3f в организме обезьян циномогус на основе 2-компарментной модели ФК с TMDD в центральном компартменте.

Данные о ФК, RO, общих уровнях рецептора и ФД в организме обезьян анализировали с использованием 2-компарментной модели ФК с насыщаемым мишень-опосредованным распределением лекарственного средства (TMDD) в центральном компартменте для их аккомодации к наблюдаемым в эксперименте нелинейным ФК (см. пример 12 и фиг. 13). Для описания ФД-ответа применяли модель ингибирования прямого действия. Эта модель позволяла эффективно описывать зависимость от времени ФК/RO/ФД, наблюдаемую у обезьян. Наблюдаемые в исследовании (незакрашенные кружки) и предсказанные на основе модели конечные точки (сплошная линия) представлены на фиг. 16А (0,1 мг/кг, подкожное дозирование) и 16Б (10 мг/кг, подкожное дозирование). В табл. 7 представлены установленные ФК/ФД-параметры. Когда данные об экспозиции в сыворотке варианта mAb 0318-IgG1.3f и RO TREM-1 объединяли для всех обезьян, было выявлено зависимое от концентрации повышение RO (см. фиг. 16А и 16Б). На основе модели E_{max} , которую применяли для описания зависимости концентрация-RO, установленная величина EC_{50} RO in vivo составляла $1,6 \pm 0,2$ нМ.

Таблица 7

Оценки параметров модели ФК/ФД, применяемой для описания ФК/ТК/ФД-данных у обезьян и оценки прогнозируемых параметров у человека

ФК-параметры	Описание	Оценка на основе цино-модели (CV%)	Прогнозируемая оценка параметров для человека
Ka (h-1)	Константа скорости абсорбции	0,049 (15)	0,049
V1 (мл/кг/кг)	Объем распределения в центральном компартменте	22 (5)	22
Ke (h-1)	Константа скорости элиминации из центрального компартмента	0,003 (10)	0,0019
K12 (h-1)	Константы скорости распределения	0,024 (14)	0,015
K21 (h-1)		0,022 (7)	0,014
F (%)	Биодоступность при SC-введении	80 (5)	80
Kdeg (h-1)	Константа скорости обращения	0,09 (20)	0,09
Kint (h-1)	Константа скорости интернализации комплекса мишень-МАт	0,39 (18)	0,39
RO (нмоли/кг)	Исходный уровень мишени в центральном компартменте	0,024 (22)	0,024
KD (нМ)	Аффинность МАт к TREM-1	0,64 (12)	0,24
Koff (h-1)	Скорость диссоциации МАт от TREM-1	0,37 (7)	0,30
IC50 (нМ)	Концентрация, требуемая для ингибирования опосредуемой PGN+PGRP стимуляции <i>ex-vivo</i> TREM-1 на 50%	1,9 (92)	0,1
E0 (%)	Исходная опосредуемая PGN+PGRP стимуляция <i>ex vivo</i> TREM-1 (перед введением дозы)	100 (фиксированное значение)	100

SEQ ID	Описание	Последовательности
50	318-IgG1.3f, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTTFSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKLTEDTAVYYCTRDMGIRRFQFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPCCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
51	318-IgG1.1f тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTTFSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKLTEDTAVYYCTRDMGIRRFQFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPCCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
52	318-IgG1-Aba, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTTFSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKLTEDTAVYYCTRDMGIRRFQFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
53	318-IgG4-Aba, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTTFSTYAMHWVRQASGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKLTEDTAVYYCTRDMGIRRFQFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
54	318-IgG1.3f, IgG1.1f, IgG1-Aba, IgG4-Aba, легкая цепь	DIIVLTQSPFDLSAVSLGERATINCRASQSVDFDYSLFLHWYQQKPKGPPKLLIYRASNLESIGVDPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCQQSNQDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Данная заявка РСТ претендует на приоритет предварительной заявки на патент США 62/651605, зарегистрированной 2 апреля 2018 г., полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Выделенное антитело, которое специфически связывается с триггерным рецептором-1, экспрессируемым на миелоидных клетках (TREM-1), содержащее
 CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;
 CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и
 константную область тяжелой цепи IgG1,
 в котором CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRFQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,
 в котором CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и
 в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три или более аминокислотных замен, где замены включают L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), или
 в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три или более аминокислотных замен и одну или более делеций, где замены включают L234A, L235E и G237A (EU-нумерация).
- Антитело по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, в котором VH содержит SEQ ID NO: 14 и VL содержит VL SEQ ID NO: 15.
- Антитело по п.2, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 85 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.
- Антитело по п.1, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 85 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.
- Антитело по п.1, содержащее тяжелую цепь, где в тяжелой цепи отсутствует С-терминальный остаток лизина.
- Антитело по п.1, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислотные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация).
- Антитело по п.1, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислотные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), и в котором С-терминальный остаток в константной области тяжелой цепи IgG1 присутствует.
- Антитело по п.1, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислотные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), и в котором С-терминальный остаток в константной области тяжелой цепи IgG1 отсутствует.
- Антитело по п.2, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислот-

ные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация).

10. Антитело по п.2, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислотные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), и в котором С-терминальный остаток в константной области тяжелой цепи IgG1 присутствует.

11. Антитело по п.2, в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три аминокислотные замены, где заменами являются L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), и в котором С-терминальный остаток в константной области тяжелой цепи IgG1 отсутствует.

12. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее

CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой цепи;

CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи; и

константную область тяжелой цепи IgG1,

в котором CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи содержат TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) и DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) соответственно,

в котором CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи содержат RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28) и QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) соответственно, и

в котором константная область тяжелой цепи IgG1 содержит три или более аминокислотных замен, включающих L234A, L235E и G237A (EU-нумерация), и

в котором С-терминальный остаток в константной области тяжелой цепи IgG1 отсутствует.

13. Антитело по п.12, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, в котором VH содержит SEQ ID NO: 14 и VL содержит VL SEQ ID NO: 15.

14. Антитело по п.13, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 85 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

15. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 85 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

16. Тяжелая цепь, предназначенная для получения антитела, которое специфически связывается с TREM-1, включающая SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 85.

17. Тяжелая цепь по п.16, включающая SEQ ID NO: 50.

18. Тяжелая цепь по п.16, включающая SEQ ID NO: 85.

19. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 50 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

20. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 51 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

21. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TREM-1, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 52 и в котором легкая цепь содержит SEQ ID NO: 54.

22. Биспецифическая молекула, включающая антитело по любому из пп.1-15 или 19-21, связанное с молекулой, имеющей вторую связывающую специфичность.

23. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-15 или пп.19-21.

24. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.23.

25. Клетка - продуцент антитела по любому из пп.1-15 или пп.19-21, содержащая вектор по п.24.

26. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-15 или пп.19-21, сцепленное с терапевтическим агентом.

27. Композиция для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-15 или пп.19-21, биспецифическую молекулу по п.22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор по п.24 или иммуноконъюгат по п.26 и носитель.

28. Набор для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, содержащий антитело по любому из пп.1-15 или 19-21, биспецифическую молекулу по п.22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор по п.24 или иммуноконъюгат по п.26 и инструкцию по применению.

29. Способ ингибирования активности TREM-1 у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение индивидууму антитела по любому из пп.1-15 или пп.19-21, биспецифической молекулы по п.22, нуклеиновой кислоты по п.23, вектора по п.24 или иммуноконъюгата по п.26.

30. Способ лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение индивидууму антитела по любому из пп.1-15 или пп.19-21, биспецифической молекулы по п.22, нуклеиновой кислоты по п.23, вектора по п.24 или иммуноконъюгата по п.25.

31. Способ по п.30, где воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона (CD), неспецифического язвенного колита (UC), синдрома раздраженного кишечника, ревматоидного артрита (RA), псориаза, псориазического артрита, системной красной волчанки (SLE), волчаночного нефрита, васкулита,

сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), диабета типа I, болезни Грейвса, рассеянного склероза (MS), аутоиммунного миокардита, болезни Kawasaki, сердечной недостаточности, хронического обструктивного заболевания легких, интерстициального заболевания легких, аутоиммунного тиреоидита, склеродермы, системного склероза, остеоартрита, атопического дерматита, витилиго, реакции "трансплантат-против хозяина", синдрома Шегрена, аутоиммунного нефрита, синдрома Гудпасчера, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, аллергии, астмы, других аутоиммунных заболеваний, являющихся результатом либо острого, либо хронического воспаления, и любой их комбинации.

32. Способ по п.29, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

33. Способ по п.31, где воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Крона (CD).

34. Способ по п.31, где воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание представляет собой неспецифический язвенный колит (UC).

35. Способ лечения болезни Крона (CD) у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение выделенного антитела по п.15 указанному индивидууму.

36. Способ лечения неспецифического язвенного колита (UC) у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение выделенного антитела по п.15 указанному индивидууму.

37. Способ лечения болезни Крона (CD) у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение выделенного антитела по п.19 указанному индивидууму.

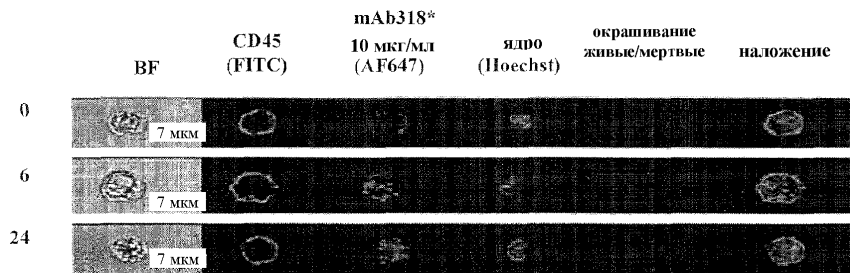
38. Способ лечения неспецифического язвенного колита (UC) у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение выделенного антитела по п.19 указанному индивидууму.

Вариант	Аналит	kon (1/Мс)	koff (1/Мс)	KD (нМ)
IgG1.3f	hu-TREM1	1.4E+06	1.3E-03	0.91
IgG1.3f	cy-TREM1	4.0E+05	1.4E-03	3.4

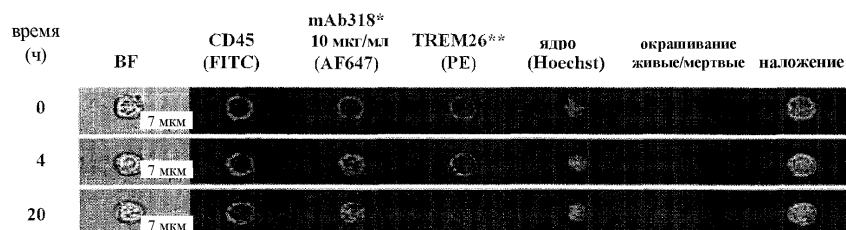
Фиг. 1А

Вариант	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
IgG4 A	1.42E+06	1.43E-03	1.01E-09	333	0.234
IgG4 B	1.46E+06	1.43E-03	9.8E-10	334	0.228
IgG1.1f	1.64E+06	1.42E-03	8.66E-10	400	0.301
IgG1.3f	1.65E+06	1.40E-03	8.50E-10	373	0.282
IgG4-Aba CT (mod)	1.70E+06	1.51E-03	8.89E-10	374	0.25
IgG1-Aba CT (mod)	1.62E+06	1.45E-03	8.99E-10	342	0.255
IgG1.1f (мутант с заменой М на Q)	1.66E+06	1.88E-03	1.13E-09	347	0.277
IgG4 (мутант с заменой М на Q)	1.46E+06	1.85E-03	1.26E-09	376	0.262
IgG4 (мутант с заменой М на L)	1.29E+06	3.56E-03	2.75E-09	340	0.348

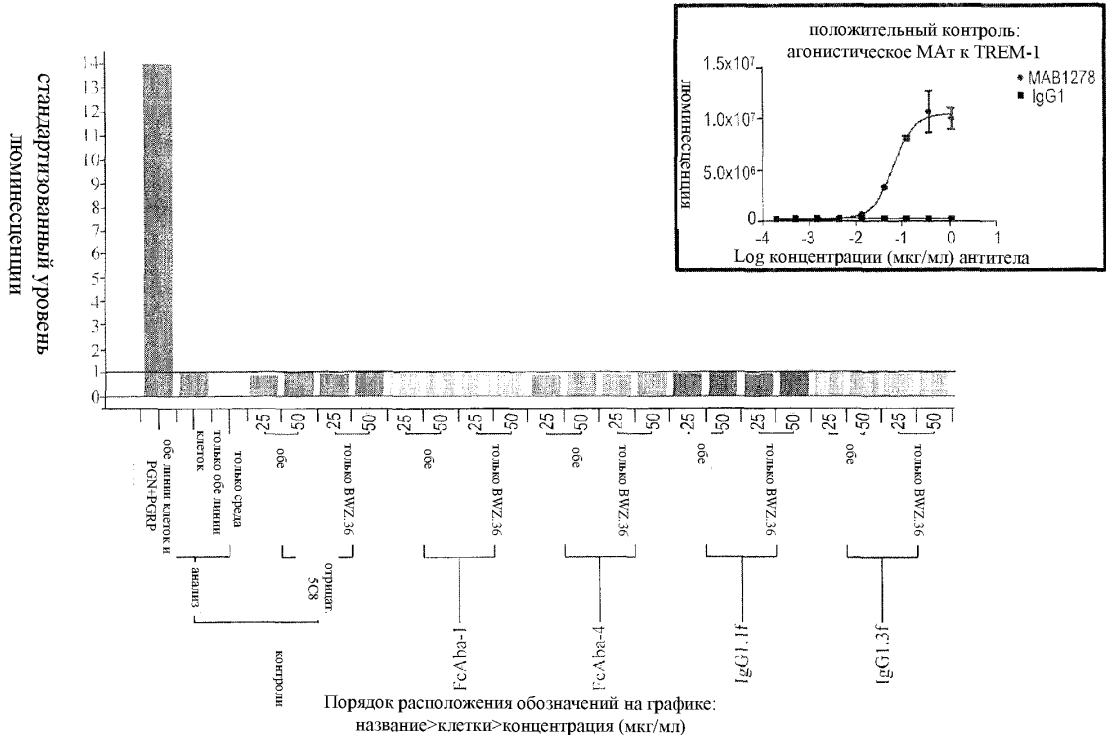
Фиг. 1Б



Фиг. 2А



Фиг. 2Б



Фиг. 3

Тип клеток	Анализ	Стимул	mAb 0318-IgG4 IC ₅₀ (пМ)	mAb 0318-IgG1.3f IC ₅₀ (пМ)	mAb 0318-IgG1.1f IC ₅₀ (пМ)	mAb 0318-IgG1-Aba IC ₅₀ (пМ)	mAb 0318-IgG4-Aba IC ₅₀ (пМ)
PBMC	TNF-α	PGRP + PGN-Ecdss	42 (N=3)	25 (N=12)	14 (N=9)	20 (N=3)	19 (N=3)
	IL-6		N/D	32,26 (N=2)	N/D	N/D	N/D
моноциты	TNF-α	PGRP + PGN-Ecdss	4 (N=3)	11 (N=9)	9 (N=12)	12,5 (N=3)	15,5 (N=3)
стимулир. эндогенным лигандом моноциты	TNF-α	эндогенный PGRP стимулирован. РМА нейтрофилов	44 (N=3)	22 (N=6)	19 (N=6)	26 (N=6)	17 (N=6)
цельная кровь после осаждения RBC	TNF-α	PGRP + PGN-Ecdss	55 (N=6)	96 (N=6)	63 (N=9)	58 (N=3)	94 (N=3)
	IL-6		68,4 (N=6)	N/D	N/D	N/D	N/D
нейтрофилы	IL-8	PGRP + PGN-Ecdss	37,5 (N=3)	9 (N=3)	N/D	N/D	N/D

Фиг. 4

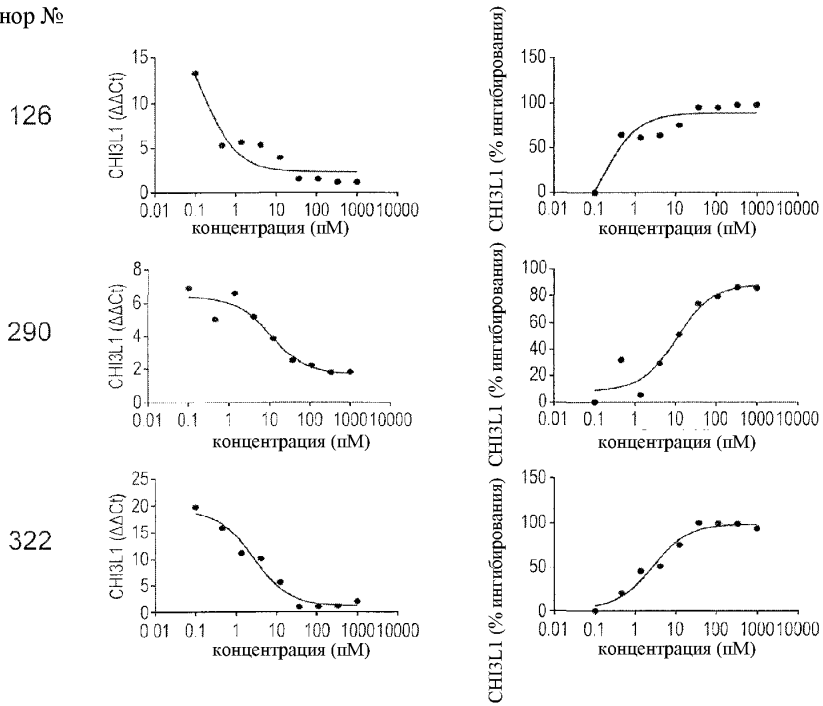
Доноры	Экспрессия цитокина IL-8 (пг/мл)			Ингибирование mAb 0318-IgG1.3f	
	Только PGN	PGRP/PGN	Кратность изменения	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (пМ)
298	518	4886	9	81	11
294	391	2319	6	81	14
322	425	1420	3	82	11
344	393	1188	3	61	12
351	388	1318	3	92	9
356	276	1377	5	62	12
				Средн. IC ₅₀ (пМ)	12
				Ст. отклонение IC ₅₀ (пМ)	2

Фиг. 5А

Доноры	%IL-8-позитивных клеток (только PGN)	%IL-8 ⁺ -клеток (PGRP+PGN)	IC ₅₀ (пМ)	IC ₅₀ (пМ) (средн. значение ± С.К.О.)
A	0.019	19.2	20.5	19.6±0.012
B	0.057	12.4	27.5	
C	0.043	21.1	36.0	
D	0.097	03.90	ND*	
E	0.025	29.25	5.2	
F	0.046	19.25	8.7	
G	0.021	04.04	ND*	

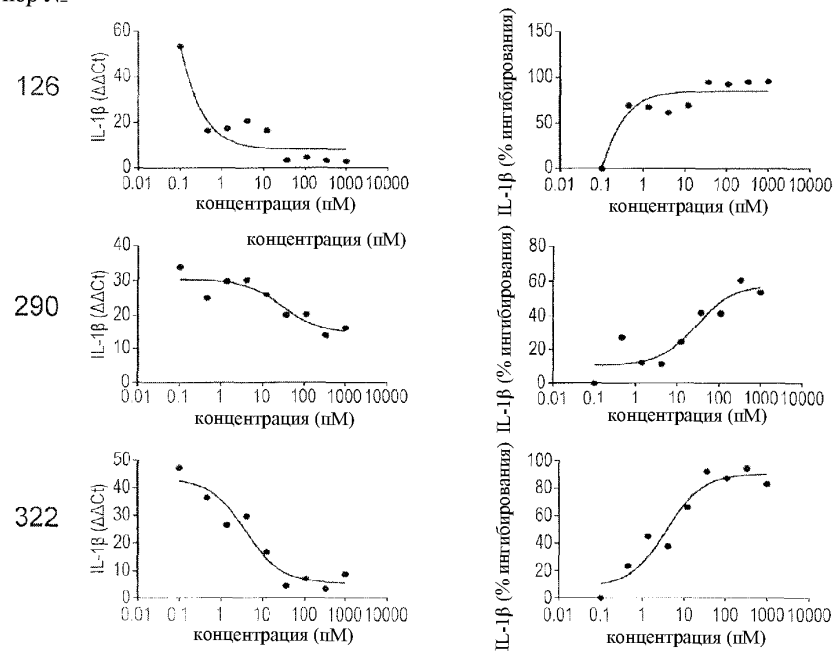
Фиг. 5Б

Донор №



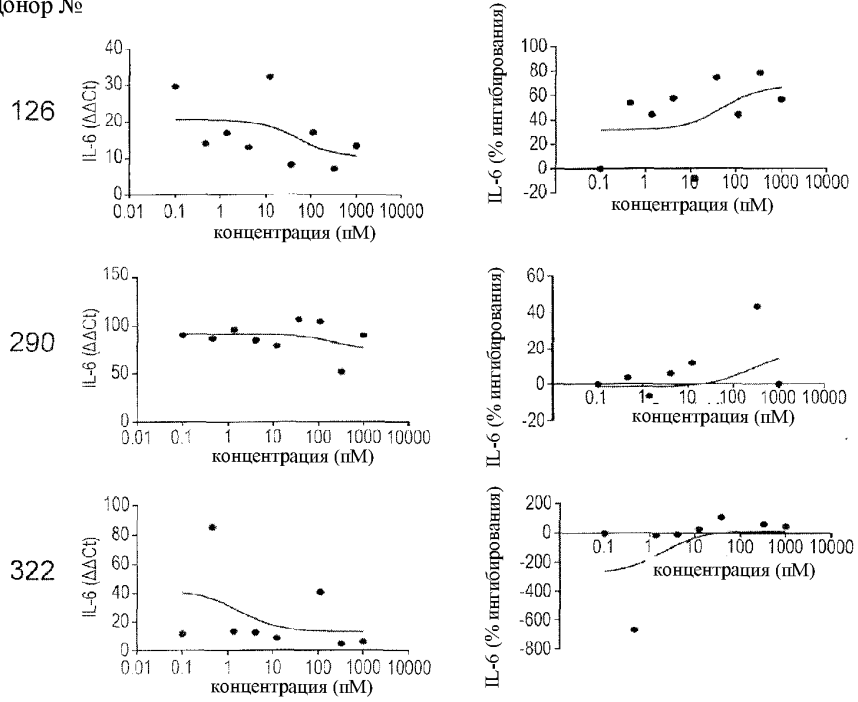
Фиг. 6А

Донор №

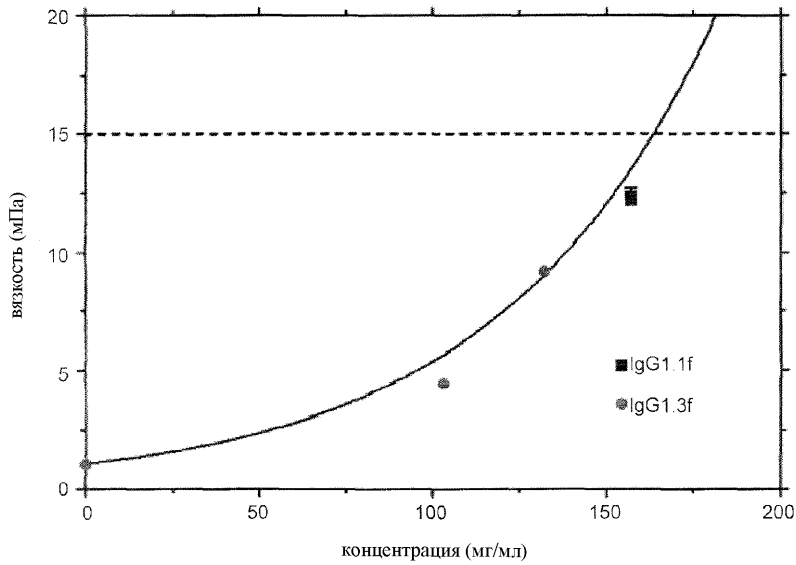


Фиг. 6Б

Донор №

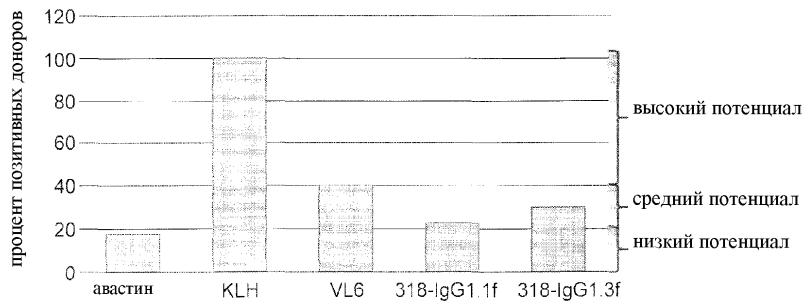


Фиг. 6В



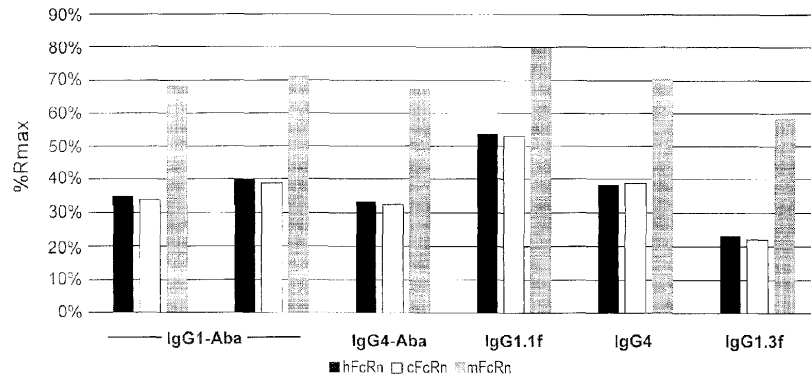
Фиг. 7

Иммуногенный потенциал антитела к TREM-1
(40 доноров РВМС)

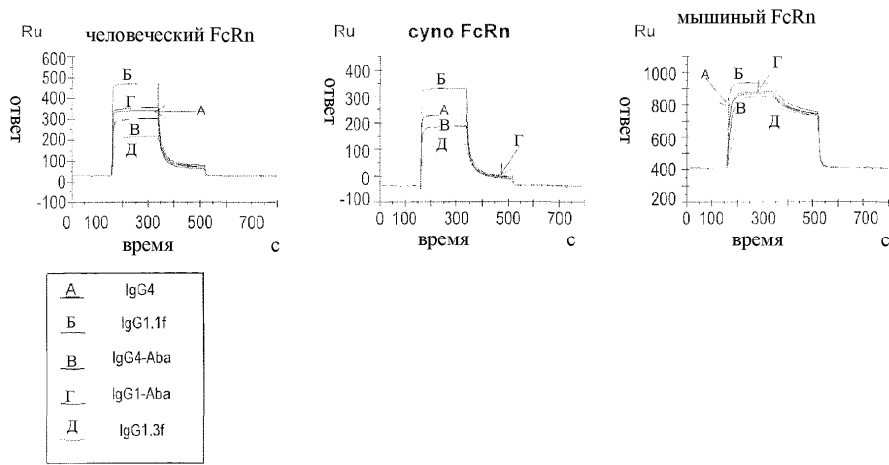


Фиг. 8

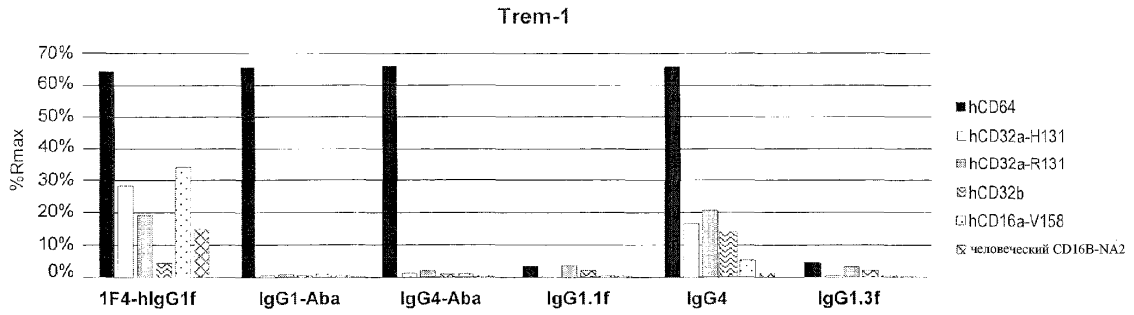
%Rmax образцов TREM-1, связывающихся с иммобилизованным FcRn



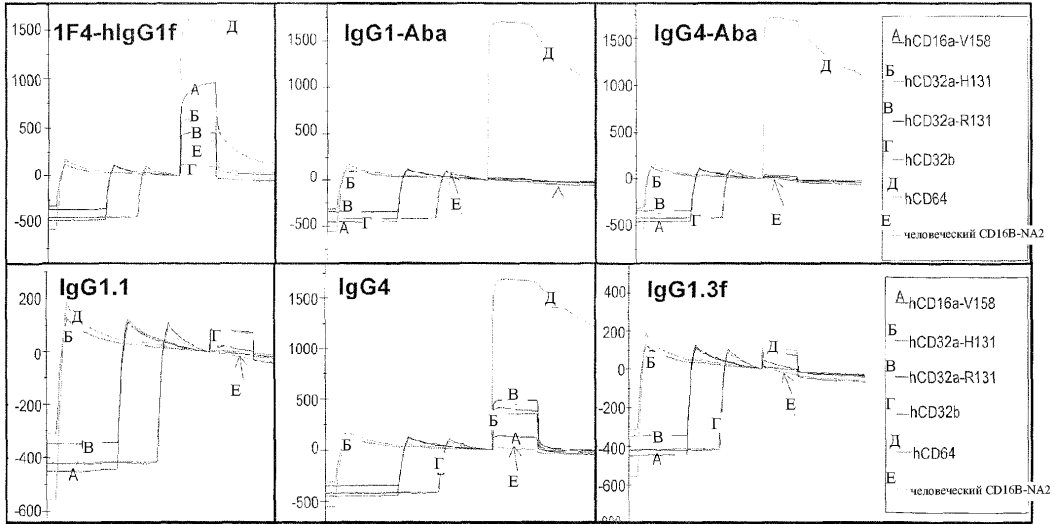
Фиг. 9А



Фиг. 9Б

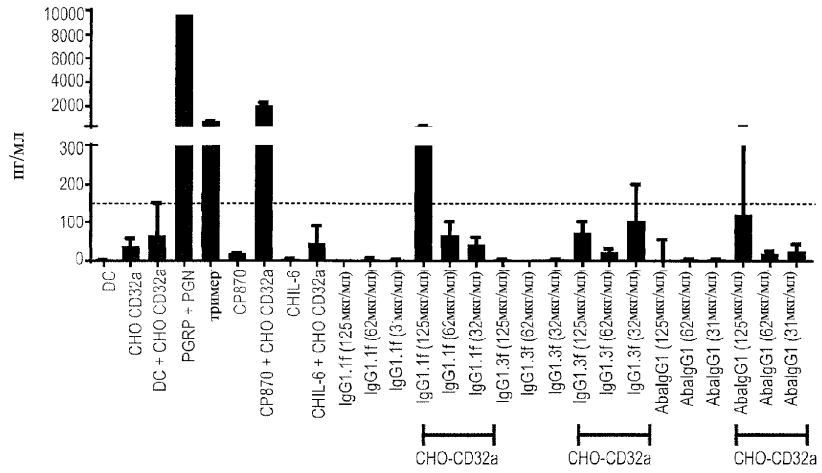


Фиг. 10А



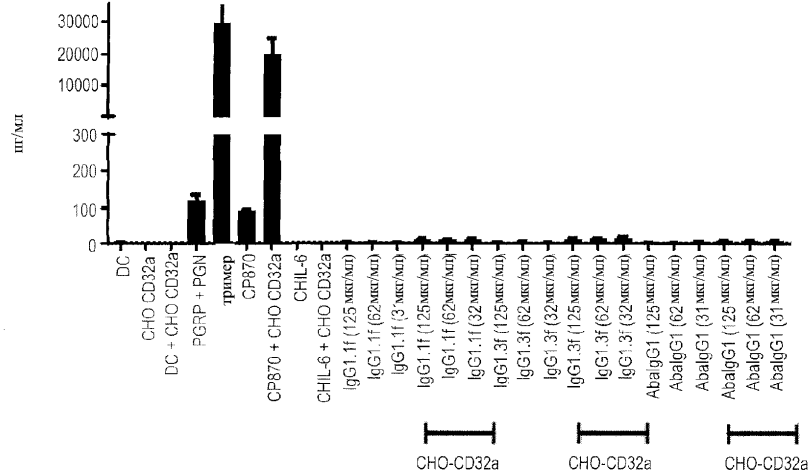
Фиг. 10Б

D179_IL6_ELISA

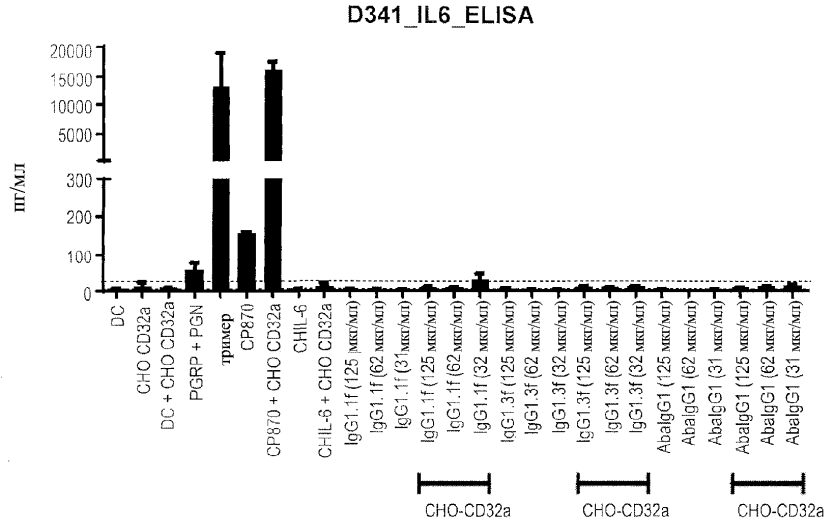


Фиг. 11А

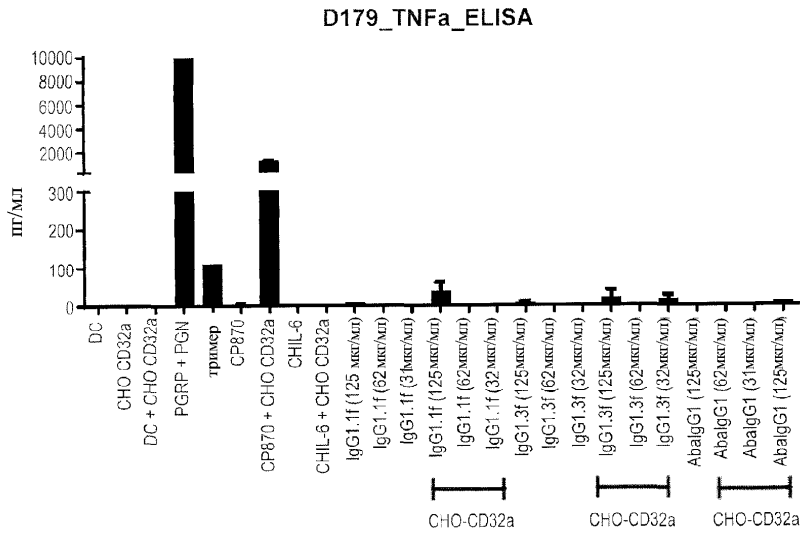
D276_IL6_ELISA



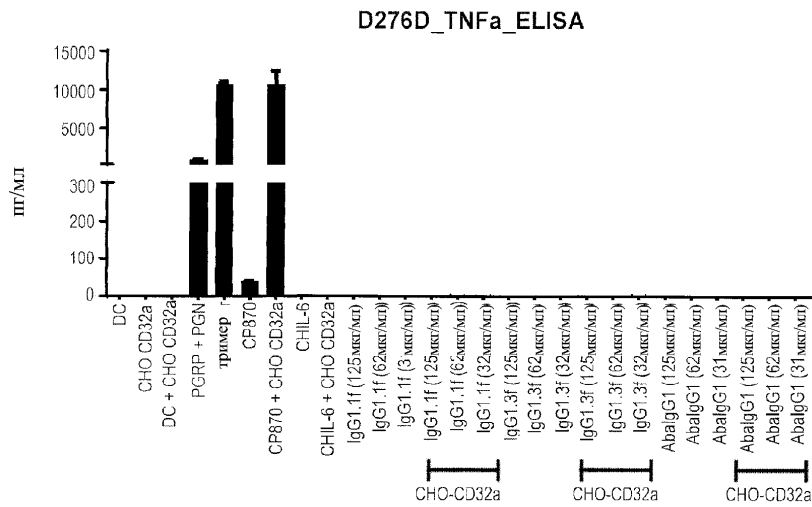
Фиг. 11Б



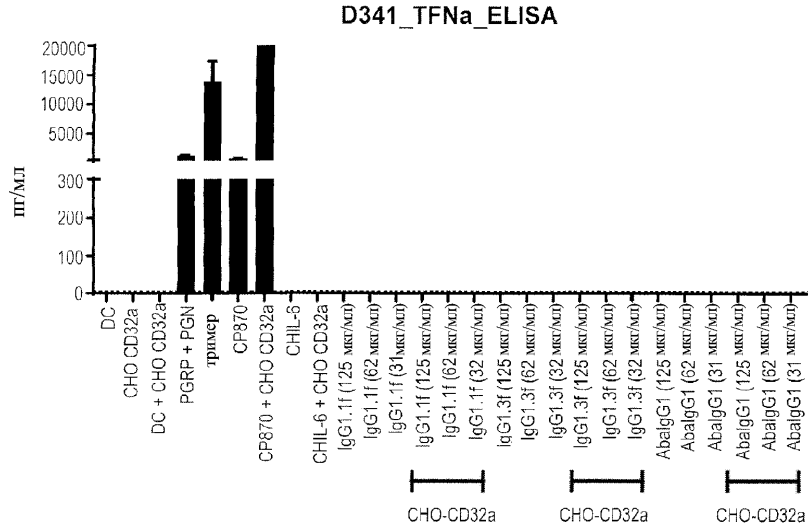
Фиг. 11В



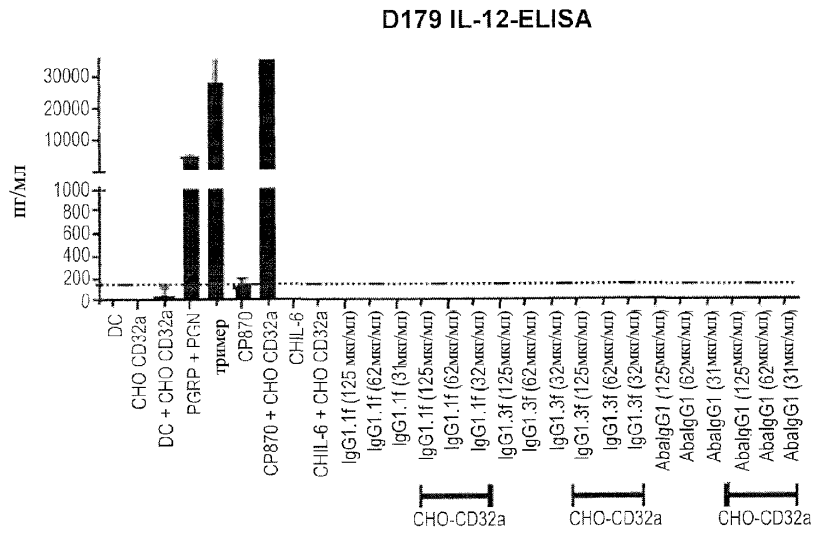
Фиг. 11Г



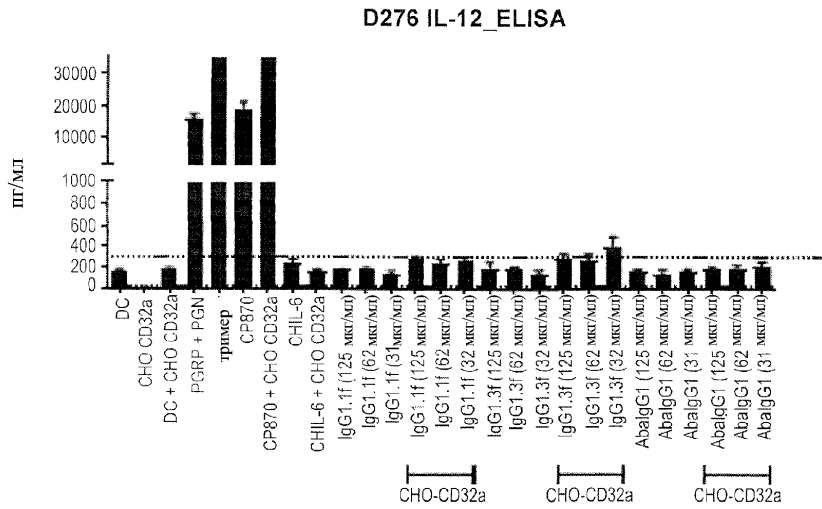
Фиг. 11Д



Фиг. 11Е

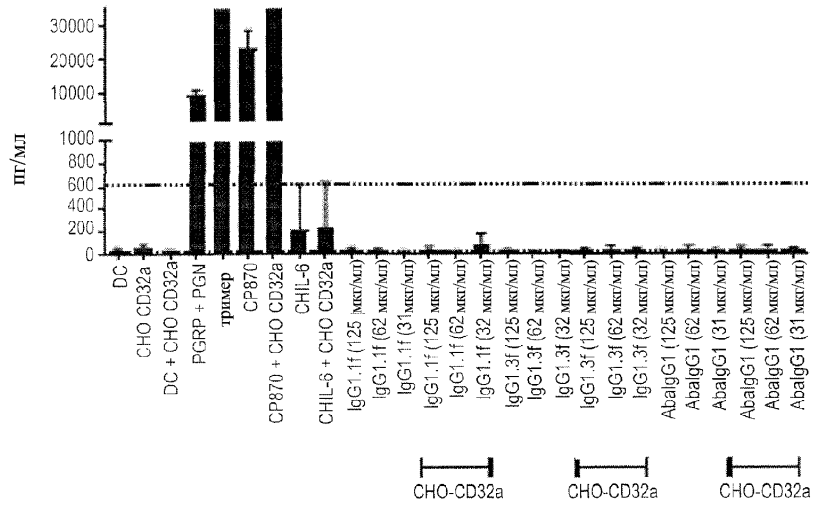


Фиг. 11Ж

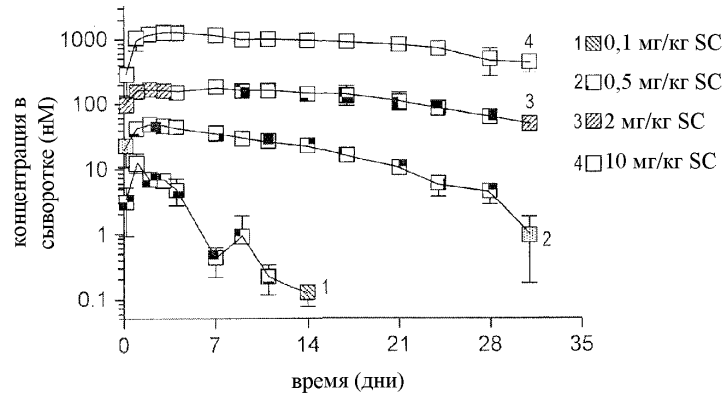


Фиг. 11З

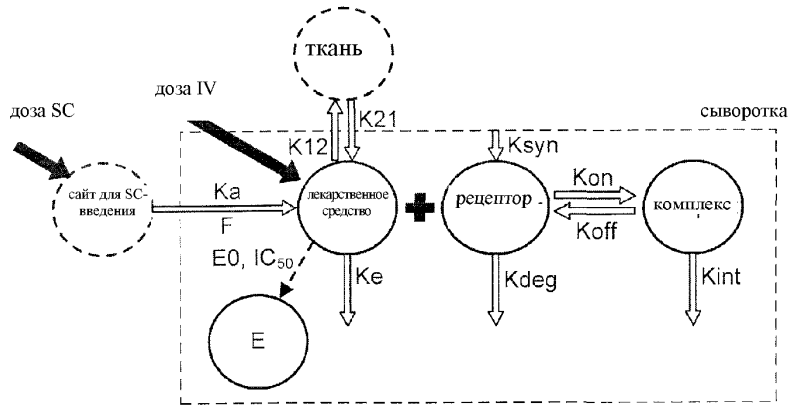
D341 IL-12-ELISA



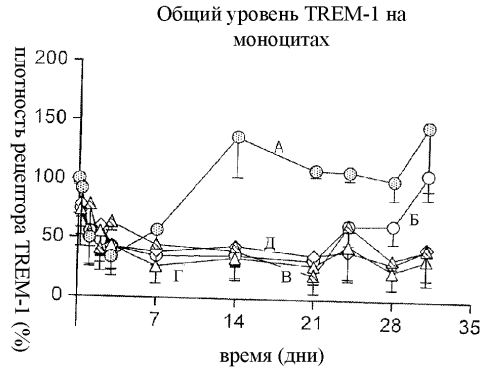
Фиг. 11И



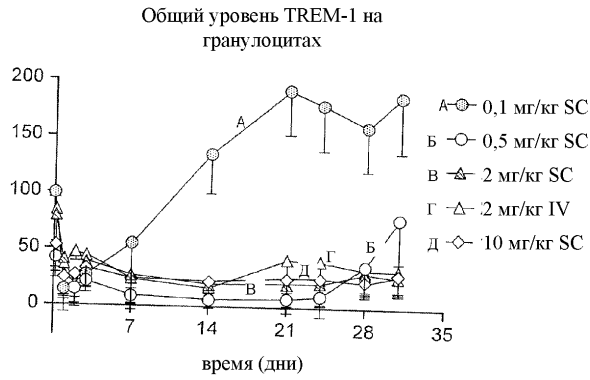
Фиг. 12



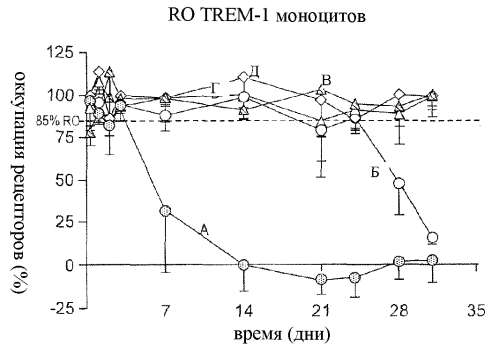
Фиг. 13



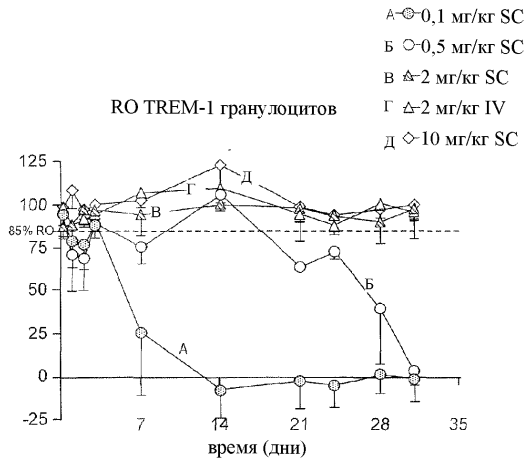
Фиг. 14А



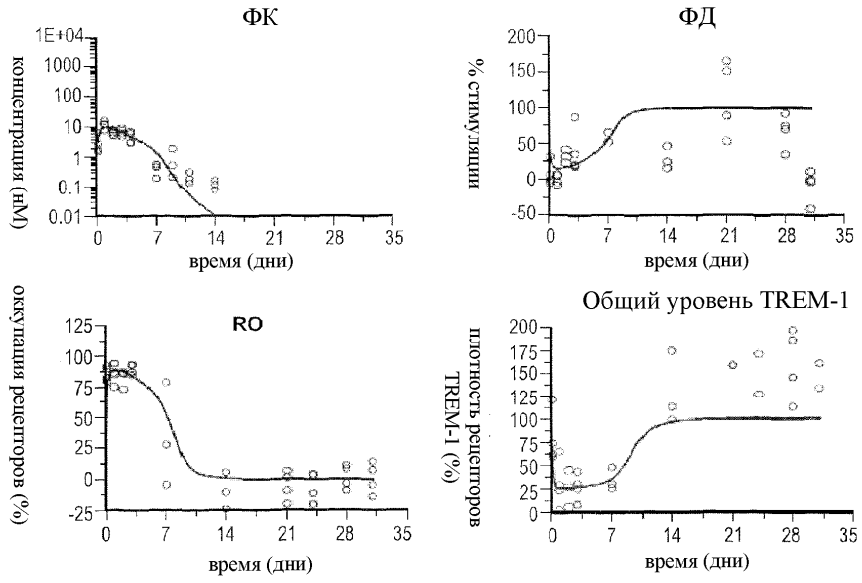
Фиг. 14Б



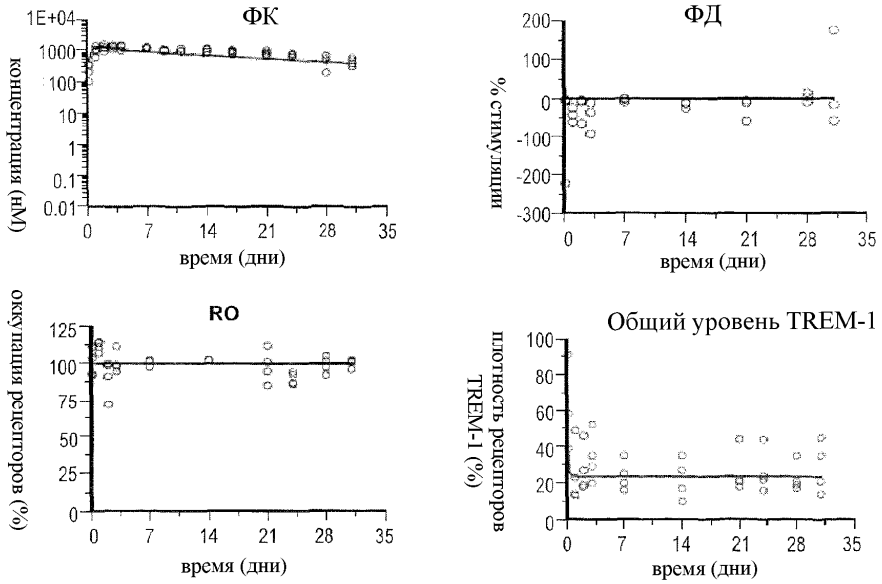
Фиг. 15А



Фиг. 15Б



Фиг. 16А



Фиг. 16Б

