



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033606

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2017-00127

(22) 17/07/2015

(86) PCT/EP2015/066501 17/07/2015

(87) WO2016/009086 21/01/2016

(30) 14177547.8 17/07/2014 EP; 14194893.5 26/11/2014 EP

(45) 25/10/2022 415

(43) 26/06/2017 351A

(73) NOVO NORDISK A/S (DK)

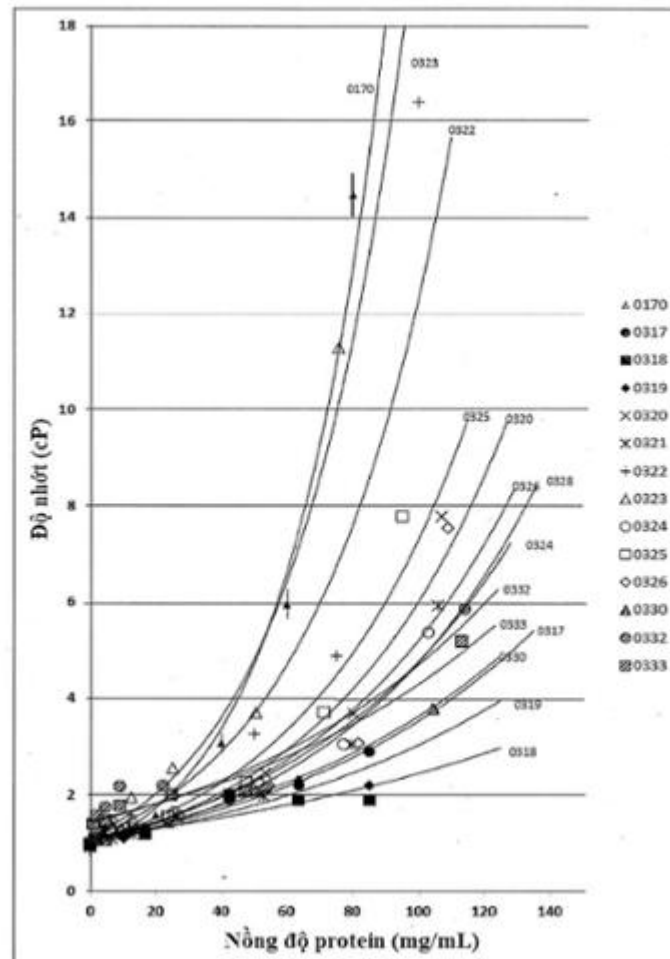
Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Denmark

(72) HENRIKSEN, Anette (DK); KJAERGAARD, Kristian (DK); WESTPHAL
STENNICKE, Vibeke (DK); WIBERG, Charlotte (DK).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VÀ PHONG BỀ TREM-1

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu và ngăn ngừa quá trình hoạt hóa TREM-1 - protein được biểu hiện trên các bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và bạch cầu trung tính có cả ái lực tốt lẫn độ nhớt thấp ở nồng độ có liên quan về mặt lâm sàng. Kháng thể này có tác dụng điều trị bệnh viêm, như bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm ruột.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng TREM-1 và quá trình tạo đột biến của axit amin mang điện tích âm đặc hiệu và không mang điện tích có liên quan tới quá trình tự tương tác của kháng thể đơn dòng TREM-1 hoặc TREM-1 mAb với quá trình tương tác TREM-1 để làm giảm độ nhớt của dung dịch mAb và duy trì ái lực đích, và được phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

TREM-1 là thụ thể hoạt hóa được biểu hiện trên bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và bạch cầu trung tính. Các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong bệnh viêm mạn tính bằng cách giải phóng xytokin và các chất trung gian khác gây ra chứng viêm. Sự biểu hiện của ARN thông tin và protein của TREM-1 được điều hòa tăng ở đối tượng bị bệnh với RA và IBD, và các tế bào dương tính với TREM-1 sẽ tích lũy ở các vị trí viêm, liên quan tới mức độ trầm trọng của bệnh. Protein nhận biết peptidolycan 1 (PGLYRP1) biểu hiện chủ yếu bởi các bạch cầu trung tính đã được hoạt hóa là phối tử với TREM-1 và truyền tín hiệu TREM-1 trong khi gắn kết.

In vitro, dự định TREM-1 gây tiết xytokin tiền viêm kể cả TNF, IL-8, và protein hóa bạch cầu đơn nhân-1. Ngoài ra, sự truyền tín hiệu TREM-1 phối hợp với nhiều thụ thể tương tự Toll (TLR) để làm tăng mạnh hơn nữa quá trình truyền tín hiệu siêu viêm. Kết quả là, điều này làm điều hòa tăng mức biểu hiện TREM-1, khiến cho chu trình này trở nên không thích hợp làm nặng thêm chứng viêm. Đã có nhiều bằng chứng chỉ ra rằng các TLR góp phần vào quá trình phát triển và tiến triển của bệnh viêm mạn tính như RA và IBD.

WO 2013/120553 đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 nhân tạo mà ức chế cả chức năng TREM-1 của người lẫn của khỉ đuôi dài. Tuy nhiên, đặc tính độ nhớt của các kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 có thể cản trở quá trình sản xuất sản phẩm thuốc ở nồng độ >50mg/mL và có thể hạn chế việc thiết lập liều tối ưu về mặt lâm sàng. Liều cao (một vài mg/kg) của protein điều trị bệnh thường là cần thiết để thu được tác dụng thích hợp về mặt lâm sàng và do phần lớn các thuốc điều trị bệnh này được sử dụng bằng cách phân phối dưới da, nên việc tự dùng thuốc điều trị bệnh này cho đối tượng bị

bệnh bị giới hạn ở thể tích $< 1,5\text{mL}$ (Shire et al., J. Pharm. Sci. 2004, 93, 1390-1402). Việc phát triển chế phẩm protein với nồng độ cao cho đối tượng bị bệnh tự dùng là trở ngại chung trong việc sản xuất và phân phối khi chế phẩm protein làm tăng độ nhớt của dung dịch thu được.

Việc phân bố điện tích của kháng thể đơn dòng đã được nghiên cứu về sự ảnh hưởng đến độ nhớt của dung dịch mAb (Ydav et al., Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802). Ngoài ra, đã nhận thấy rằng sự tương tác điện tích yếu, không đặc hiệu vẫn có mặt trong các dung dịch pha loãng làm ảnh hưởng đến độ nhớt của các dung dịch mAb cô đặc (Connolly et al., Biophys. J., 2012, 103, 69-78.). Các phương thức điều trị để làm giảm độ nhớt của dung dịch mAb là cần đưa các thể đột biến trao đổi điện tích hướng vị trí mà phá vỡ các tương tác nội phân tử điện tích-điện tích trực tiếp (Ydav et al., Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802) hoặc bổ sung muối hoặc ion trái dấu (Liu et al., J. Pharm. Sci. 2005, 94, 1928-1940; Yadav et al., J. Pharm. Sci. 2010, 99, 1152-1168; Yadav et al., J. Pharm. Sci. 2012, 101, 998-1011; Kanai et al., J. Pharm. Sci. 2008, 97, 4219-4227) vào. Tuy nhiên, việc bổ sung các muối và ion trái dấu có thể gây ra tác dụng phụ cho đối tượng bị bệnh liên quan tới nồng độ siêu osmol/kg dung dịch đã được sử dụng.

Sáng chế bộc lộ kháng thể TREM-1 được tạo ra bằng cách tạo đột biến đặc hiệu vị trí của CDR của WO 2013/120553 đã được bộc lộ là kháng thể đơn dòng 01070 kháng TREM-1 nhân tạo. Các kháng thể đã được bộc lộ không phá vỡ quá trình tự tương tác điện tích-điện tích nội phân tử mAb trực tiếp có đặc tính độ nhớt thích hợp và duy trì được đặc tính gắn kết đích. Đặc tính độ nhớt thích hợp cho phép sản phẩm thuốc ở nồng độ cao có thể là cần thiết để sử dụng trong điều trị bệnh và dược phẩm. Các kháng thể này có thể có ảnh hưởng quan trọng đến chất lượng cuộc sống của các đối tượng bị bệnh nhiễm khuẩn hoặc bệnh viêm mạn tính như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh khớp vẩy nến và bệnh viêm ruột.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 có đặc tính độ nhớt trong khoảng kỳ vọng đối với các kháng thể đơn dòng monome và phong bế chức năng của TREM-1 với mức độ mạnh như kháng thể đơn dòng 0170 của

WO 2013/120553. Hơn nữa, đối với đặc tính độ nhớt có lợi của các biến thể kháng thể đơn dòng theo sáng chế, đã nhận thấy rằng các biến thể này không đối kháng với thụ thể TREM-1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết và phong bế TREM-1, khác biệt ở chỗ kháng thể này, hoặc mảnh của nó, có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP ở nồng độ bằng 80mg/mL, tốt hơn nếu nhỏ hơn 4 cP.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó một hoặc nhiều gốc mang điện tích âm trong vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thế bằng các gốc axit amin không mang điện tích, như được nêu trong bản mô tả này.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó phenylalanin ở vị trí 32 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành axit amin được chọn từ các gốc axit amin glyxin, serin, threonin, xystein, alanin, valin, leuxin, isoleuxin và metionin, tốt hơn nếu được chọn từ alanin, glyxin, serin valin và leuxin, tốt hơn nữa nếu trong đó F32 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành alanin hoặc serin.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một gốc bất kỳ trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 3 (các thể đột biến “tương tác Fab-Fab”) được thế bằng axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết đặc hiệu và phong bế TREM-1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 và chứa các biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 hoặc cả hai trình tự này, trong đó các biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm các thể đột biến “tương tác Fab-Fab”, thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1” và thể đột biến dạng “mảng điện tích” của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 (bảng 1).

Theo một phương án của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh của nó, một hoặc nhiều gốc mang điện tích âm trong vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ

ID NO.3 được thể bằng các gốc axit amin không mang điện tích. Theo một phương án, gốc mang điện tích âm trong vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 này được thể bằng các gốc axit amin không mang điện tích.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó một gốc bất kỳ trong số các gốc dạng “mảng điện tích” D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Theo một phương án, nhiều hơn một gốc “mảng điện tích” D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin.

Theo một phương án, một trong số E27 và E97 của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng gốc axit amin không mang điện tích, như axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Bằng cách ví dụ, E27 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể không được tạo đột biến và E97 có thể được tạo đột biến bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin. Theo cách khác, E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể không được tạo đột biến và E27 có thể được thể bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin.

Theo một phương án, cả E27 và E97 của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng các gốc axit amin không mang điện tích, như axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Bằng cách ví dụ, E27 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể được biến đổi thành glutamin và E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể được thể bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự nêu trong SEQ. ID. NO 2, trong đó một gốc bất kỳ trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 (thể đột biến “tương tác Fab-Fab”) được thể bằng axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin.

Theo một phương án của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh của nó, ít nhất một gốc trong số các gốc A59 và N57 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 được tạo đột biến thành gốc axit amin, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin. Bằng cách ví dụ, A59 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể không được tạo đột biến và N57 có thể được tạo đột biến thành gốc axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin. Theo cách khác, N57 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể không được tạo đột biến và A59 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể được tạo đột biến thành gốc axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin. Theo phương án khác, cả A59 lẫn N57 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 được tạo đột biến thành gốc axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến khả năng đánh giá tiền lâm sàng cải thiện thu được bằng cách đưa các thể đột biến hướng vị trí trong SEQ ID NO.3 trong các gốc axit amin “tương tác Fab-TREM-1” để thu được ái lực mAb đối với TREM-1 của khi đuôi dài tương tự như đối với TREM-1 của người có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, ví dụ trong đó gốc Phe của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng Ala hoặc Ser.

Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó, trong đó gốc axit amin “tương tác Fab-TREM-1”, F32 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, được thể bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, threonin, prolin và xystein.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tác dụng kết hợp của các đặc tính về độ nhớt cải thiện và khả năng đánh giá tiền lâm sàng cải thiện thu được bằng cách đưa các thể đột biến hướng vị trí trong SEQ ID NO.2 ở bề mặt chung mAb-TREM-1 để tạo ra được ái lực mAb đối với khỉ đuôi dài tương tự như ái lực tồn tại đối với TREM-1 của người có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (ví dụ, như được nêu trên) kết hợp với việc thể các gốc mang điện tích âm trong các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 bằng các gốc axit amin không mang điện tích (ví dụ, như được nêu trên).

Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó trong đó:

i) ít nhất một gốc mang điện tích âm của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin; và

ii) ít nhất một gốc trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 (thể đột biến “tương tác Fab-Fab”) được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, và tryptophan, histidin và tyrosin.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó trong đó:

i) một hoặc cả hai E27 lẫn E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin; và

ii) một hoặc cả hai A59 lẫn N57 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 đến 16.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện đặc tính độ nhót của các biến thể kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 và đường cong theo hàm số mũ của chúng.

Fig.2 là đồ thị thể hiện khả năng của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 để ức chế quá trình truyền tín hiệu TREM-1 của người trong dòng tế bào chỉ thị TREM-1 của người (BWZ'36/hTREM-1) đã được kích thích bởi PGN và (A) PGLYRP1 tái tổ hợp hoặc (B) PGLYRP1 được biểu hiện bởi các bạch cầu trung tính đã được hoạt hóa (số lượng trung bình của các người cho N).

Fig.3 là đồ thị thể hiện khả năng của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 để ức chế quá trình truyền tín hiệu TREM-1 của khi đuôi dài trong dòng tế bào chỉ thị TREM-1 của khi đuôi dài (TE426.27) đã được kích thích bởi PGN và PGLYRP1 tái tổ hợp.

Fig.4 là đồ thị thể hiện khả năng của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 để ức chế quá trình giải phóng TNF α ra khỏi đại thực bào M2 bị giảm oxy huyết đã được kích thích bởi PGN và PGLYRP1 tái tổ hợp.

Fig.5 là đồ thị thể hiện khả năng gắn kết trên đĩa đôi kháng của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 để giải phóng TNF ra khỏi đại thực bào M2 bị giảm oxy huyết. MAb 1278 (R&D) được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương tính.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện bán kính thủy động của các biến thể kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 so với kháng thể đơn dòng 0170.

Mô tả chi tiết sáng chế

*Các trình tự được sử dụng trong sáng chế

SEQ ID NO.1 là trình tự axit amin của TREM-1 thể đại của người.

SEQ ID NO.2 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553).

SEQ ID NO.3 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553).

SEQ ID NO.4 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0317, E27Q, E97S).

SEQ ID NO.5 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0318, E27Q, E97Q).

SEQ ID NO.6 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0319, E97S).

SEQ ID NO.7 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0320, E97Q).

SEQ ID NO.8 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0321, E27Q).

SEQ ID NO.9 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0322, F32A).

SEQ ID NO.10 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0323, F32S).

SEQ ID NO.11 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0324, A59Y).

SEQ ID NO.12 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0325, N57S).

SEQ ID NO.13 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0326, A59Y, N57S).

SEQ ID NO.14 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0330, F32A, E27Q, E97Q).

SEQ ID NO.15 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0332, A59Y; 0332 là mAb kết hợp của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15 như HC và SEQ ID NO.5 như LC, Bảng 1).

SEQ ID NO.16 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1 (kháng thể đơn dòng 0333, A59Y; 0333 là mAb kết hợp của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16 như HC và SEQ ID NO.14 như LC, Bảng 1).

SEQ ID NO.17 là trình tự axit amin của cTREM-1 có chiều dài đầy đủ.

SEQ ID NO.18 là chuỗi nặng của vùng Fab của kháng thể đơn dòng 0170.

SEQ ID NO.19 là chuỗi nhẹ của vùng Fab kháng thể đơn dòng 0170.

TREM-1 là protein xuyên màng được cấu thành bởi 234 axit amin, bao gồm một miền globulin miễn dịch ngoại bào và đuôi bào chất ngắn mà không có môtip truyền tín hiệu rõ ràng. Khi được hoạt hóa, TREM-1 liên kết với protein thích ứng truyền tín hiệu chứa ITAM, DAP12. Quá trình truyền tín hiệu xảy ra ở phía sau có thể bao gồm quá trình hoạt hóa yếu tố phiên mã NFAT, làm điều hòa tăng quá trình sản sinh xytokin tiền viêm.

Sáng chế đề cập đến kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu và phong bế chức năng của TREM-1. Các kháng thể theo sáng chế có thể phong bế chức năng của TREM-1 bằng cách làm giảm/phong bế quá trình hoạt hóa và truyền tín hiệu xảy ra ở phía sau TREM-1.

Các kháng thể theo sáng chế có thể phong bế TREM-1 bằng một hoặc kết hợp một vài cơ chế khác nhau, phong bế TREM-1 trực tiếp hoặc gián tiếp. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể ngăn không cho phối tử tự nhiên của TREM-1, protein nhận biết peptidoglycan 1 (PGLYRP1), tạo phức chức năng với TREM-1 và/hoặc kháng thể theo sáng chế có thể phong bế TREM-1 bằng cách ngăn không cho các phân tử TREM-1 riêng rẽ tạo ra các đime hoặc multime. Quá trình đime hóa hoặc multime hóa TREM-1 có thể được làm giảm hoặc ngăn cản bởi các kháng thể TREM-1 có khả năng gắn kết với một phần TREM-1 mà theo cách khác có thể nằm trên bề mặt chung của đime TREM-1, nhờ đó ngăn không cho các phân tử TREM-1 riêng rẽ liên kết với phân tử khác.

Quá trình đime hóa hoặc multime hóa TREM-1 có thể được làm giảm hoặc ngăn cản bởi kháng thể TREM-1 mà gây ảnh hưởng đến sự tương tác của TREM-1 với phối tử của nó. Các kháng thể theo sáng chế có thể phong bế quá trình hoạt hóa gây ra bởi PGLYRP1 của TREM-1. PGLYRP1 là protein mạch dài có 196 axit amin, được bảo toàn ở mức cao, được cấu thành bởi peptit tín hiệu và miền gắn kết với peptidoglycan, được biểu hiện trong bạch cầu trung tính và được giải phóng trong quá trình hoạt hóa chúng. Các kháng thể theo sáng chế có thể điều hòa tăng quá trình giải phóng xytokin tiền viêm ra khỏi các tủy bào. Các kháng thể theo sáng chế có thể phong bế quá trình giải phóng TNF, MIP-1beta, MCP-1, IL-1beta, GM-CSF, IL-6 và/hoặc IL-8 ra khỏi đại thực bào,

bạch cầu trung tính, tế bào mô hoạt dịch và/hoặc tế bào chỉ thị, như được nêu trong bản mô tả này.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết với cả TREM-1 của người lẫn TREM-1 từ các loài khác không phải người. Do đó, thuật ngữ “TREM-1”, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao hàm dạng có mặt trong tự nhiên bất kỳ của TREM-1 có thể có nguồn gốc từ sinh vật thích hợp bất kỳ. Ví dụ, TREM-1 được sử dụng như nêu trong bản mô tả này có thể là TREM-1 của động vật có xương sống, như TREM-1 động vật có vú, như TREM-1 từ động vật linh trưởng (như người, tinh tinh, khỉ đuôi dài hoặc khỉ nâu); loài gặm nhấm (như chuột nhắt hoặc chuột), động vật gặm nhấm (như thỏ), hoặc động vật có guốc chân (như bò, cừu, lợn hoặc lạc đà). Tốt hơn, nếu TREM-1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người). TREM-1 có thể là dạng trưởng thành của TREM-1 như protein TREM-1 mà diễn ra quá trình sau phiên mã trong tế bào thích hợp. Ví dụ, protein TREM-1 trưởng thành này có thể được glycosyl hóa. TREM-1 có thể là protein TREM-1 có chiều dài đầy đủ.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đơn dòng, tức là chúng có nguồn gốc trực tiếp hoặc gián tiếp từ một dòng của lymphô bào B. Kháng thể TREM-1 có thể được tạo ra, được sàng lọc và được làm sạch bằng cách sử dụng, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong Ví dụ của WO2013/120553. Tóm lại, chuột nhắt thích hợp như chuột nhắt không có (knock-out - KO) TREM-1 hoặc TREM-1/TREM-3 có thể được tạo miễn dịch với TREM-1, tế bào biểu hiện TREM-1 hoặc tổ hợp của hai loại này.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng, tức là hỗn hợp chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Việc sàng lọc sơ cấp dịch nổi chứa tế bào lai có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA hoặc FMAT trực tiếp và việc sàng lọc thứ cấp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích tế bào theo dòng chảy. Sau đó, dịch nổi chứa tế bào lai dương tính có thể được sàng lọc trong thử nghiệm gen chỉ thị.

Các kháng thể có thể được biểu hiện tái tổ hợp trong các tế bào của sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật có nhân điển hình. Sinh vật nhân sơ tế bào có thể là *E. coli*. Tế bào của sinh vật có nhân điển hình có thể là tế bào của nấm men, côn trùng hoặc động vật có vú, như tế bào có nguồn gốc từ sinh vật là động vật linh trưởng (như người, tinh tinh, khỉ

đuôi dài hoặc khi nâu), loài gặm nhấm (như chuột nhắt hoặc chuột), động vật gặm nhấm (như thỏ) hoặc động vật có guốc chân (như bò, cừu, lợn hoặc lạc đà). Dòng tế bào thích hợp của động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào HEK293, tế bào CHO và tế bào HELA. Kháng thể TREM-1 cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như biểu hiện thể thực khuẩn hoặc biểu hiện nấm men.

Một khi được tạo ra, các kháng thể có thể được sàng lọc để gắn kết với, ví dụ, TREM-1 có chiều dài đầy đủ hoặc thể đột biến của chúng bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế của WO2013/120553.

Kháng thể TREM-1 chức năng theo sáng chế là các kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với TREM-1 và có hiệu quả trong quá trình hoạt hóa TREM-1 và quá trình truyền tín hiệu xảy ra ở phía sau bằng cách phong bế hoặc kích thích TREM-1 và trong bản mô tả này, chúng được gọi là “kháng thể TREM-1 chức năng”. Phương pháp nhận diện kháng thể TREM-1 chức năng bao gồm các bước: (a) nuôi cấy tế bào thứ nhất biểu hiện TREM-1, protein tín hiệu và cấu trúc thông báo; (b) xác định hoạt tính của tế bào thứ nhất này khi tế bào này được ủ với chất cải biến TREM-1; (c) cho đồng môi trường nuôi cấy của bước (b) tiếp xúc với kháng thể TREM-1; và (d) xác định xem hoạt tính của tế bào thứ nhất này có yếu hơn hay mạnh hơn so với hoạt tính xác định được ở bước (b) hay không.

“Tế bào thứ nhất” của bước (a) có thể là tế bào có nguồn gốc từ quá trình tạo máu, như tế bào tủy, như tế bào T. Protein tín hiệu của bước (a) có thể là protein tín hiệu bất kỳ có khả năng tạo phức với TREM-1. Protein tín hiệu thích hợp bao gồm DAP10, DAP12, TCR zeta, Fc gamma RIII và thụ thể Fc, hoặc một phần của chúng. Cấu trúc thông báo của bước (a) có thể là cấu trúc bất kỳ có khả năng hoạt hóa thông qua protein tín hiệu và tạo ra tín hiệu có thể nhận biết được. Cấu trúc thông báo thích hợp bao gồm yếu tố phiên mã và gen thông tin. Protein tín hiệu có thể là tín hiệu thông qua yếu tố phiên mã được chọn từ nhóm bao gồm NFAT và NFkB. Gen chỉ thị là gen mà không được biểu hiện trong tự nhiên trong tế bào thứ nhất này và có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen mã hóa β -galactosidaza, luxiferaza, protein phát huỳnh quang màu xanh lá (GFP) hoặc chloramphenicol transferaza. Tế bào thứ nhất này có thể được chuyển nhiễm với yếu tố

phiên mã và gen chỉ thị bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

“Tế bào chỉ thị BWZ/hTREM-1” và “tế bào chỉ thị TE426.27” được mô tả trong các ví dụ thực hiện sáng chế là một ví dụ về “tế bào thứ nhất”.

Chất cải biến của bước (b) có thể là phối tử TREM-1 hoặc bạch cầu trung tính được hoạt hóa. “Kháng thể TREM-1” của bước (c) có thể là dịch nổi thể lai đặc hiệu với TREM-1 hoặc kháng thể đã được làm sạch. Hoạt tính được xác định ở bước (d) là tín hiệu tạo ra bởi cấu trúc thông báo. Ví dụ về quá trình truyền tín hiệu này là việc phát quang gây ra bởi quá trình tạo ra LacZ (β -lactamaza luxiferaza) gây ra bởi NFAT.

Phương pháp này có thể được điều chỉnh để xác định kháng thể TREM-1 phong bế. Phương pháp nhận diện kháng thể TREM-1 phong bế bao gồm các bước: (a) nuôi cấy tế bào thứ nhất biểu hiện TREM-1, protein tín hiệu và cấu trúc thông báo; (b) xác định hoạt tính của tế bào thứ nhất này khi tế bào này được ủ với bạch cầu trung tính đã được hoạt hóa; (c) cho đồng môi trường nuôi cấy của tế bào thứ nhất này và bạch cầu trung tính đã được hoạt hóa tiếp xúc với kháng thể TREM-1; và (d) xác định xem hoạt tính của tế bào thứ nhất này có yếu hơn so với hoạt tính xác định được ở bước (b) hay không.

Phương pháp này cũng có thể được điều chỉnh để xác định kháng thể TREM-1 kích thích. Phương pháp nhận diện kháng thể TREM-1 kích thích bao gồm các bước: (a) nuôi cấy tế bào thứ nhất biểu hiện TREM-1, protein tín hiệu và cấu trúc thông báo; (b) xác định hoạt tính của tế bào thứ nhất này; (c) tiếp xúc/ủ tế bào này với kháng thể TREM-1; và (d) xác định xem hoạt tính của tế bào thứ nhất này có mạnh hơn so với hoạt tính xác định được ở bước (b) hay không.

Sáng chế đề cập đến kháng thể TREM-1 phong bế có thể được nhận diện bằng phương pháp, như được nêu trong bản mô tả này, nhận diện kháng thể phong bế. Khi được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp nêu trong bản mô tả này và trong các ví dụ thực hiện sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể, ở nồng độ nhỏ hơn 50 μ g/mL, như nhỏ hơn 40 μ g/mL, như nhỏ hơn 30 μ g/mL, như nhỏ hơn 20 μ g/mL, như nhỏ hơn 10 μ g/mL, như nhỏ hơn 5 μ g/mL, như nhỏ hơn 1 μ g/mL - có khả năng làm giảm hoạt tính của tế bào thứ nhất xuống 50%, như 60%, như 70%, như 80%, như 90%, như 95%, như 100%. Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng làm mất hoàn toàn hoạt tính của tế

bào thứ nhất này. Khi được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp nêu trong bản mô tả này và trong các ví dụ thực hiện sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể, ở nồng độ nhỏ hơn $1\mu\text{g/mL}$ - như nhỏ hơn $0,9\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,8\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,7\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,6\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,5\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,4\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,3\mu\text{g/mL}$, như nhỏ hơn $0,2\mu\text{g/mL}$ - có khả năng làm mất hoạt tính của tế bào thứ nhất.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể TREM-1 phong bế có thể được nhận diện bằng các cách khác không phải phương pháp nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein, có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi, có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (TREM-1) hoặc một phần của chúng. Thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc nhóm hoặc isotyp bất kỳ (tức là IgA, IgE, IgG, IgM và/hoặc IgY) và chuỗi đơn hoặc mảnh bất kỳ của nó. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên, hoặc một phần của nó, hoặc có thể gắn kết với kháng nguyên đó, hoặc một phần của chúng, hoặc nó có thể gắn kết với số lượng giới hạn các kháng nguyên đồng nhất, hoặc các phần của chúng. Các kháng thể có chiều dài đầy đủ thường chứa ít nhất bốn chuỗi polypeptit: hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bởi liên kết disulfua. Một phân nhóm globulin miễn dịch của chất dùng trong được phẩm cụ thể là họ IgG. Ở người, nhóm IgG có thể được phân nhóm tiếp thành 4 phân nhóm: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, dựa trên trình tự của vùng hằng định của chuỗi nặng của chúng. Các chuỗi nhẹ có thể được chia thành hai loại, kappa và lamda, dựa trên sự khác nhau về thành phần trình tự của chúng. Các phân tử IgG được cấu thành bởi hai chuỗi nặng, được nối liên kết bởi hai hoặc nhiều liên kết disulfua, và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi này được gắn vào chuỗi nặng bởi liên kết disulfua. Chuỗi nặng có thể chứa vùng biến đổi (VH) của chuỗi nặng và tối đa ba vùng hằng định (CH) của chuỗi nặng: CH1, CH2 và CH3. Chuỗi nhẹ có thể chứa vùng biến đổi (VL) của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ (CL). Các vùng VH và VL có thể được phân nhóm tiếp thành các vùng của siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ sung (CDR), được nằm rải rác với các vùng được bảo toàn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Các vùng VH và VL này thường cấu thành bởi ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng

siêu biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tạo ra miền [gắn kết] có khả năng tương tác với kháng nguyên, trong khi đó vùng hằng định của kháng thể có thể gắn kết globulin miễn dịch với mô hoặc yếu tố chủ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (tế bào tác động), thụ thể Fc và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ bổ trợ truyền thống.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập. Thuật ngữ “kháng thể phân lập” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể được phân tách và/hoặc thu hồi từ các thành phần khác trong môi trường mà trong đó nó được tạo ra và/hoặc làm sạch khỏi hỗn hợp chứa các thành phần có mặt trong môi trường mà trong đó nó đã được tạo ra.

Các mảnh gắn kết với kháng nguyên nhất định của các kháng thể có thể là thích hợp theo sáng chế, vì đã thấy rằng chức năng gắn kết với kháng nguyên này của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ “mảnh gắn kết với kháng nguyên” của kháng thể được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể vẫn có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên, như TREM-1, như được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ về mảnh gắn kết với kháng nguyên bao gồm các mảnh Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)S, Fv (thường là các miền VL và VH của một nhánh của kháng thể), Fv chuỗi đơn (scFv; xem, ví dụ, các bài báo: Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; và Huston et al. PNAS 1988; 85:5879-5883), dsFv, Fd (thường là miền VH và CHI), và dAb (thường là miền VH); các miền VH, VL, VhH, và V-NAR; phân tử hóa trị một chứa chuỗi VH đơn và VL đơn; tiểu thể, lưỡng thể, tam thể, tứ thể, và các thể kappa (xem, ví dụ, bài báo: Ill et al., Protein Eng 1997;10:949-57); IgG; IgNAR của lạc đà; cũng như một hoặc nhiều CDR phân lập hoặc paratop chức năng, trong đó CDR phân lập hoặc các gốc hoặc polypeptit gắn kết với kháng nguyên có thể được nối hoặc liên kết với nhau để tạo ra mảnh kháng thể chức năng. Các mảnh kháng thể khác nhau đã được mô tả hoặc xem xét trong, ví dụ, bài báo: Holliger and Hudson, Nat Biotechnol 2005; 2S:1126-1136; WO2005040219, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 20050238646 và 20020161201. Các mảnh kháng thể này có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các mảnh này có thể được sàng lọc để sử dụng theo cùng cách như kháng thể nguyên vẹn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể của người hoặc kháng thể nhân tạo. Thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để kể cả các kháng thể có vùng biến đổi trong đó ít nhất một phần của vùng khung và/hoặc ít nhất một phần của vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người. (Ví dụ, kháng thể của người có thể có vùng biến đổi, trong đó cả vùng khung lẫn vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người). Hơn thế nữa, nếu kháng thể chứa vùng hằng định, thì vùng hằng định này cũng có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người. Các kháng thể của người theo sáng chế có thể kể cả các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người (ví dụ, các thể đột biến được đưa vào bởi quá trình tạo đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bởi thể đột biến xoma *in vivo*).

Kháng thể này của người có thể là kháng thể đơn dòng của người. Kháng thể đơn dòng này của người có thể được tạo ra bởi thể lai, mà kể cả tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải là người, ví dụ, chuột nhắt chuyển gen, có bộ gen chứa gen chuyển chứa chuỗi nặng của người và gen chuyển chứa chuỗi nhẹ được ngưng tụ thành tế bào bất động.

Các kháng thể của người có thể được phân tách từ các thư viện trình tự được xây dựng dựa vào việc lựa chọn trình tự dòng phôi của người, được đa dạng hóa tiếp với tính đa dạng trình tự tự nhiên và tổng hợp.

Các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch *in vitro* của lymphô bào của người, tiếp đó là biến nạp các lymphô bào này với virus Epstein-Barr.

Thuật ngữ “dẫn xuất kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng cải biến bất kỳ của kháng thể của người, như thể tiếp hợp của kháng thể này và chất khác hoặc kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thể khảm của người/không phải của người chứa một hoặc nhiều trình tự (vùng CDR hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Do đó, kháng thể nhân tạo là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận), trong đó ít nhất các gốc từ vùng siêu biến đổi của thể nhận này được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến

đổi của kháng thể từ các loài không phải của người (kháng thể cho) như từ chuột nhắt, chuột, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người, có độ đặc hiệu, ái lực, thành phần trình tự và tính năng mong muốn. Trong một vài trường hợp, các gốc FR của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ví dụ về việc cải biến như vậy là đưa một hoặc nhiều thể đột biến ngược, thường là các gốc axit amin có nguồn gốc từ kháng thể cho. Quá trình nhân tạo của kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, do Benny K. C. Lo biên tập). Khung nhận của người thích hợp đối với cả miền biến đổi của chuỗi nhẹ lẫn chuỗi nặng có thể được nhận diện bởi, ví dụ, tính tương đồng trình tự hoặc cấu trúc. Theo cách khác, khung nhận cố định có thể được sử dụng, ví dụ, dựa trên kiến thức về đặc tính cấu trúc, sinh lý và hóa sinh. Các khung nhận có thể là dòng phôi dẫn xuất hoặc có nguồn gốc từ trình tự kháng thể trưởng thành. Vùng CDR từ kháng thể cho có thể được vận chuyển bằng cách ghép CDR. Kháng thể nhân tạo được ghép với CDR có thể được tối ưu hóa tiếp về, ví dụ, ái lực, tính năng và đặc tính sinh lý bằng cách nhận diện các vị trí khung quan trọng trong đó việc đưa vào lại (tạo đột biến ngược) gốc axit amin từ kháng thể cho ảnh hưởng có lợi tới các đặc tính của kháng thể nhân tạo. Ngoài kháng thể cho có nguồn gốc từ các thể đột biến ngược, kháng thể nhân tạo có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bằng cách đưa các gốc dòng phôi trong vùng CDR hoặc vùng khung, loại bỏ các epitop sinh miễn dịch, tạo đột biến hướng vị trí, tạo đột biến ái lực v.v..

Hơn thế nữa, kháng thể nhân tạo có thể chứa các gốc không được tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được tạo ra để lọc tiếp tính năng của kháng thể. Nói chung, kháng thể nhân tạo chứa ít nhất một - thường là hai - miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc hầu như tất cả các vùng CDR tương ứng với vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người và trong đó tất cả hoặc hầu như tất cả các vùng CDR của các gốc FR có trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể nhân tạo có thể, tùy ý, còn chứa ít nhất một phần vùng hằng định (Fc) của globulin miễn dịch, thông thường vùng của globulin miễn dịch của người.

Thuật ngữ “dẫn xuất kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng cải biến bất kỳ của kháng thể nhân tạo, như thể tiếp hợp của kháng thể này và chất khác hoặc kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể mà các gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xây dựng, thông thường bằng kỹ thuật di truyền, từ các gen của vùng biến đổi và vùng hằng định của globulin miễn dịch có nguồn gốc từ các loài khác nhau. Ví dụ, các đoạn biến đổi của gen từ kháng thể đơn dòng của chuột nhắt có thể được nối với các đoạn ổn định của người.

Vùng dễ tạo tinh thể của mảnh (“vùng Fc”/“miền Fc”) của kháng thể là vùng có đầu N của kháng thể, chứa các miền ổn định CH2 và CH3. Miền Fc có thể tương tác với thụ thể bề mặt tế bào được gọi là các thụ thể Fc, cũng như một số protein của the complement hệ. Vùng Fc làm cho các kháng thể tương tác với the miễn dịch hệ. Theo một khía cạnh của sáng chế, các kháng thể có thể là được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để kể cả các cải biến trong vùng Fc, thông thường để biến đổi một hoặc nhiều các đặc tính chức năng của nó, như thời gian bán thải của huyết thanh, cố định bổ thể, gắn kết với thụ thể Fc, ổn định protein và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc kháng nguyên, hoặc các thiếu hụt của chúng, không kể các loại khác. Hơn thế nữa, kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc cải biến để biến đổi quá trình glycosyl hoá của nó, tiếp theo để biến đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể này. Kháng thể IgG1 có thể mang miền Fc cải biến chứa một hoặc nhiều, và có lẽ tất cả các thể đột biến sau mà làm giảm ái lực lần lượt đối với các thụ thể Fc nhất định (L234A, L235E, và G237A) và làm giảm quá trình cố định bổ thể gây ra bởi C1q (A330S và P331S), (đánh số gốc theo chỉ số EU).

Isotyp của kháng thể theo sáng chế có thể là IgG, như IgG1, như IgG2, như IgG4. Nếu muốn, nhóm kháng thể có thể “được chuyển đổi” bởi kỹ thuật đã biết. Ví dụ, kháng thể được tạo ra ban đầu là phân tử IgM có thể là nhóm được chuyển đổi thành kháng thể IgG. Kỹ thuật chuyển đổi nhóm cũng có thể được sử dụng để chuyển một phân nhóm IgG thành phân nhóm khác, ví dụ: từ IgG1 thành IgG2 hoặc IgG4; từ IgG2 thành IgG1 hoặc IgG4; hoặc từ IgG4 thành IgG1 hoặc IgG2. Kỹ thuật tạo các kháng thể để tạo ra phân tử khảm chứa vùng hằng định, bằng cách kết hợp các vùng từ các phân nhóm IgG khác nhau, cũng có thể được thực hiện.

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho số lượng các gốc xystein trong vùng bản lề được biến đổi, ví dụ, được tăng lên hoặc giảm xuống. Phương pháp này được mô tả tiếp để minh họa trong Patent Mỹ số 5,677,425 của Bodmer và các đồng tác giả.

Vùng hằng định có thể được cải biến để ổn định kháng thể, ví dụ, làm giảm nguy cơ kháng thể hóa trị hai tách thành hai mảnh VH-VL hóa trị một. Ví dụ, trong vùng hằng định IgG4, gốc S228 (đánh số gốc theo chỉ số EU) có thể được tạo đột biến thành gốc prolin (P) để ổn định quá trình tạo ra cầu disulfua ở bên trong chuỗi nặng ở vùng bản lề (xem, ví dụ, Angal *et al.*, Mol Immunol. 1995; 30: 105-8).

Các kháng thể hoặc các mảnh của chúng cũng có thể được xác định đối với vùng xác định bổ sung (CDR) của chúng. Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” hoặc “vùng siêu biến đổi” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vùng của kháng thể trong đó các gốc axit amin có liên quan tới quá trình gắn kết kháng nguyên được đặt vào vị trí. Vùng siêu biến đổi hoặc CDR có thể được nhận diện là các vùng có tính biến đổi lớn nhất khi chuỗi thẳng axit amin của miền biến đổi kháng thể. Dữ liệu có thể được sử dụng để nhận biết CDR như dữ liệu Kabat, CDR, ví dụ, được xác định khi so sánh các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-59 (L2) và 89-97 (L3) của miền biến đổi chuỗi nhẹ và 31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng; (Kabat *et al.* 1991; Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Theo cách khác, các CDR có thể được xác định là các gốc từ “vòng siêu biến” (các gốc 26-33 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196: 901-917). Thông thường, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng này được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu nêu trên của Kabat và các đồng tác giả. Thuật ngữ “vị trí Kabat”, “gốc Kabat”, và “theo Kabat” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hệ thống đánh số thứ tự đối với miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ. Bằng cách sử dụng hệ thống đánh số thứ tự Kabat, trình tự axit amin tuyến tính thực của peptit có thể chứa một vài hoặc các axit amin bổ sung tương ứng với việc rút ngắn, hoặc cài xen vào, khung (FR) hoặc CDR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng có thể kể cả các đoạn cài xen axit amin (gốc 52a, 52b và 52c theo Kabat) sau gốc 52 của CDR H2 và các gốc được cài xen

(ví dụ, các gốc 82a, 82b, và 82c v.v. theo Kabat) sau gốc 82 của chuỗi nặng FR. Các gốc đánh số Kabat có thể được xác định đối với kháng thể đưa ra bằng cách duỗi thẳng ở các vùng có tính tương đồng trình tự của kháng thể với trình tự đánh số Kabat “tiêu chuẩn”.

Thuật ngữ các gốc của “vùng khung” hoặc “FR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các gốc axit amin của VH hoặc VL mà không nằm trong CDR, như được xác định trong bản mô tả này.

Kháng thể kháng thể đơn dòng 0170 có trình tự chuỗi nặng biến đổi như được thể hiện trong SEQ ID NO.2 và trình tự chuỗi nhẹ biến đổi như được thể hiện trong SEQ ID NO.3. Kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự chuỗi nặng biến đổi này và/hoặc trình tự chuỗi nhẹ biến đổi này. Kháng thể kháng thể đơn dòng 0170 có trình tự CDR có mặt ở axit amin 31 đến 35, 50 đến 68 và 101 đến 110 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và axit amin 24 đến 38, 54 đến 60 và 93 đến 101 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3.

Chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR1 chứa axit amin 31 đến 35 (TYAMH) như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một trong số các axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR2 của axit amin 50 đến 68 (RIRTKSSNYATYYADSVKD) như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một, hai hoặc ba axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR3 của axit amin 101 đến 110 (DMGQRRQFAY) như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một, hai hoặc ba axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR1 của axit amin 24 đến 38 (RASVSDTFDYSFLH) như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó một, hai hoặc ba axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR2 của axit amin 54 đến 60 (RASNLES) như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó một hoặc hai axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDR3 của các axit amin 93 đến 101 (QQSNEDPYT) như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó một hoặc hai axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Kháng thể kháng thể đơn dòng 0170 có trình tự chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.2 và trình tự chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.3. Kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự chuỗi nặng này hoặc trình tự chuỗi nhẹ này. Chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, hoặc cả hai, có thể là biến thể của kháng thể đơn dòng 0170. Kháng thể kháng thể đơn dòng 0170 có trình tự CDR có mặt ở axit amin 31 đến 35, 50 đến 68 và 101 đến 110 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và axit amin 24 đến 38, 54 đến 60 và 93 đến 101 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3. Kháng thể theo sáng chế có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc tất cả 6 trình tự CDR này.

Chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự CDRH3 của axit amin 101 đến 110 (DMGIRRQFAY) như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một, hai hoặc ba axit amin này có thể được thế bằng axit amin khác.

Thuật ngữ “kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ phân tử sử dụng cho quá trình tạo miễn dịch cho động vật có xương sống có khả năng tạo miễn dịch để tạo ra kháng thể (Ab) nhận biết Ag này. Trong bản mô tả này, Ag được gọi theo cách rộng hơn và thường được dự định để bao gồm các phân tử đích được nhận biết đặc hiệu bởi Ab, nhờ đó kể cả các mảnh hoặc chất có tác dụng giống phân tử được sử dụng trong quá trình tạo miễn dịch, hoặc quá trình khác, ví dụ, biểu hiện thể thực khuẩn, được sử dụng để tạo ra Ab.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình tương tác phân tử giữa “polypeptit gắn kết với kháng nguyên”, như kháng thể (Ab), và kháng nguyên tương ứng của nó (Ag). Nói chung, “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khu vực hoặc vùng trên Ag mà Ab gắn kết đặc hiệu với, tức là khu vực hoặc vùng tiếp xúc vật lý với Ab. Việc tiếp xúc vật lý có thể được xác định theo tiêu chuẩn khác nhau (ví dụ, khoảng cách ngưỡng 2-6Å, như 3Å, như 4 Å, như 5Å; hoặc khả năng dễ tiếp cận dung môi) đối với nguyên tử trong phân tử Ab và Ag. Epitop protein có thể chứa các gốc axit amin trong Ag có liên quan trực tiếp trong việc liên kết với Ab (còn được gọi là thành phần tạo miễn dịch vượt trội của epitop này) và các gốc axit amin khác, mà không liên

quan trực tiếp trong việc gắn kết, như các gốc axit amin của Ag mà bị phong bế một cách hiệu quả bởi Ab, tức là các gốc axit amin trong “bề mặt loại trừ dung môi” và/hoặc “dấu vết” của Ab.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cả hai loại vùng gắn kết trong vùng cụ thể bất kỳ của TREM-1 gắn kết đặc hiệu với kháng thể TREM-1. TREM-1 có thể chứa nhiều epitop khác nhau, có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, epitop cấu trúc được cấu thành bởi một hoặc nhiều axit amin không liên tục nằm gần nhau trong cấu trúc TREM-1 trưởng thành và epitop sau phiên mã được cấu thành bởi, toàn bộ hoặc một phần, cấu trúc phân tử được liên kết hóa trị với TREM-1, như nhóm hydrat cacbon.

Epitop đối với cặp kháng thể (Ab)/kháng nguyên (Ag) nhất định có thể được mô tả và được đặc trưng ở các mức độ khác nhau bằng cách sử dụng nhiều phương pháp lập bản đồ epitop thử nghiệm và trên máy tính. Các phương pháp thử nghiệm bao gồm tạo đột biến, khảo sát tinh thể bằng tia X, quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ khối trao đổi hydro đơteri (HX-MS) và các phương pháp gắn kết cạnh tranh khác nhau; các phương pháp mà đã biết trong lĩnh vực này. Đối với mỗi phương pháp dựa vào nguyên lý duy nhất, việc mô tả epitop được liên kết chặt chẽ với phương pháp mà nó đã được xác định. Do đó, tùy thuộc vào phương pháp lập bản đồ epitop được sử dụng, epitop đối với cặp Ab/Ag nhất định có thể được mô tả khác nhau.

Ở mức độ được nêu chi tiết nhất của nó, epitop để tương tác giữa Ag và Ab có thể được mô tả bằng các tọa độ không gian xác định sự tiếp xúc nguyên tử có mặt trong quá trình tương tác Ag-Ab, cũng như thông tin về sự đóng góp tương đối của chúng với nhiệt động học gắn kết. Ở mức độ kém chi tiết hơn, epitop có thể được đặc trưng bởi các tọa độ không gian xác định sự tiếp xúc nguyên tử giữa Ag và Ab. Ở mức độ kém chi tiết hơn nữa, epitop có thể được đặc trưng bởi các gốc axit amin mà nó chứa như được xác định bởi tiêu chuẩn cụ thể như khoảng cách giữa hoặc khả năng dễ tiếp cận dung môi của nguyên tử trong phức hợp Ab:Ag. Ở mức độ kém chi tiết hơn nữa, epitop có thể được đặc trưng thông qua chức năng, ví dụ, bằng cách gắn kết cạnh tranh với Ab khác. Epitop cũng có thể được xác định phổ biến hơn khi chứa các gốc axit amin để thay thế bởi axit amin khác sẽ làm thay đổi đặc điểm tương tác giữa Ab và Ag.

Trong bản mô tả này, cấu trúc tinh thể có nguồn gốc từ tia X được xác định bởi tọa độ không gian của phức hợp giữa Ab, ví dụ, mảnh Fab, và Ag của nó, thuật ngữ epitop trong bản mô tả này, nếu không có quy định cụ thể khác hoặc đối lập với sáng chế, được xác định cụ thể là các gốc TREM-1, khác biệt ở chỗ có nguyên tử nặng (tức là nguyên tử không phải hydro) nằm trong khoảng cách của, ví dụ, 4 Å từ nguyên tử nặng trong Ab.

Từ thực tế rằng việc mô tả và định nghĩa của epitop, phụ thuộc vào phương pháp lập bản đồ epitop đã dùng, thu được ở các mức độ khác nhau, sau đó so sánh các epitop đối với các Ab khác nhau trên cùng một Ag có thể được tiến hành tương tự ở các mức độ khác nhau.

Epitop được mô tả ở mức độ axit amin, ví dụ được xác định từ cấu trúc tia X, là giống nhau nếu chúng chứa cùng một bộ gốc axit amin. Nhận thấy rằng các epitop là chồng lên nhau nếu ít nhất một axit amin có chung các epitop. Epitop được phân tách (duy nhất) nếu gốc axit amin không có chung epitop.

Epitop cũng có thể được xác định một cách gián tiếp, bằng so sánh động học gắn kết của các kháng thể với TREM-1 kiểu hoang của người với các biến thể TREM-1 của người có thể đột biến alanin trong các epitop dự đoán. Việc giảm ái lực hoặc mất khả năng gắn kết của kháng thể với các biến thể của TREM-1 của người trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc alanin chứng tỏ rằng axit amin đột biến góp phần vào sự tương tác giữa kháng thể này với TREM-1 kiểu hoang của người. Phương pháp này đưa ra việc nhận biết epitop âm tính. Phương pháp gây cản trở việc xác định epitop một cách hiệu quả do trên thực tế rằng việc lỗi gấp nếp hoặc không gấp nếp protein có thể thu được kết quả tương tự do không có quá trình tương tác. Phân tích này có thể được bổ sung bằng cách so sánh lợi ích của phân tích tạo đột biến chức năng của protein hướng đích gen trực giao (ví dụ, TREM-1 của khỉ đuôi dài), nếu tồn tại kháng thể phản ứng ngang. Việc so sánh này sẽ xác định được sự khác nhau về epitop giữa kháng thể không phản ứng ngang với, ví dụ, TREM-1 của khỉ đuôi dài và kháng thể phản ứng ngang.

Việc nhận biết gián tiếp epitop cũng có thể tạo ra bằng xác định khả năng gắn kết của kháng thể (hoặc mảnh kháng thể) với các biến thể của kháng thể kiểu hoang (TREM-1). Nếu kháng thể hoặc mảnh của nó gắn kết với, ví dụ, TREM-1 của người chứ không phải khỉ đuôi dài và nếu kháng thể này hoặc mảnh của chúng có khả năng gắn kết với

biến thể được làm giống một phần của người của TREM-1 của khi đuôi dài thì nó lại có khả năng gắn kết, chứng tỏ rằng gốc axit amin được thể là quan trọng cho quá trình tương tác của kháng thể với kháng nguyên. Theo cùng cách, ái lực gia tăng đối với các biến thể nhân tạo của TREM-1 của khi đuôi dài, của kháng thể TREM-1 kháng người (hoặc mảnh Fab của nó) có khả năng gắn kết yếu hơn so với TREM-1 của khi đuôi dài so với TREM-1 của người, có thể cung cấp thông tin về tính đồng nhất của các gốc tạo nên epitop gắn kết.

Mức độ ảnh hưởng của các thể đột biến tương tự trên kháng thể phản ứng ngang nhất định bất kỳ làm cho nó có thể phân biệt giữa việc gấp nếp lõi protein (mất khả năng gắn kết với cả hai kháng thể) và mất sự tương tác trong TREM-1 của người (gắn kết với một trong số các kháng thể và mất khả năng gắn kết với kháng thể khác), đồng thời cung cấp thông tin không rõ ràng về sự khác nhau về epitop giữa kháng thể không phản ứng ngang với kháng thể phản ứng ngang ở mức độ axit amin.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết với các biến thể của TREM-1 của người như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, cộng hưởng từ bề mặt.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết các biến thể của TREM-1 của khi đuôi dài như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, cộng hưởng từ bề mặt.

Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với TREM-1, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết đặc hiệu (i) ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A21, T22, K23, L24, T25, E26, và (ii) ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, I57, I58, R59, D60, G61, E62, M63, P64, K65, T66, L67, A68, C69, T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, I85 và (iii) ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm C113, V114, I115, Y116, Q117, P118 và P119 của TREM-1 của người.

Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu polypeptit chứa axit amin D38 đến F48 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X.

Kháng thể theo sáng chế có thể có epitop chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tất cả các gốc axit amin D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 và L45 của trình tự

như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người) và một, hai hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm E46, K47 và F48 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X.

Kháng thể theo sáng chế có thể có epitop chứa một, hai, ba hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm D42, E46, D92 và H93 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng các biến thể của TREM-1 và cộng hưởng từ bề mặt.

Kháng thể theo sáng chế có thể có epitop chứa ít nhất các gốc axit amin E46 và/hoặc D92 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng các biến thể của TREM-1 và cộng hưởng từ bề mặt.

Kháng thể theo sáng chế có thể còn chứa một, hai hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L31, I86 và V101 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (TREM-1 của người).

Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu polypeptit chứa các gốc axit amin E19 đến L26 của TREM-1 của khí đuôi dài (SEQ ID NO.17), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X.

Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48 và A49 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa tD42 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Kháng thể theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa E46 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Epitop của kháng thể này có thể chứa V39, C41, D42, Y43, L45 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Epitop của kháng thể này có thể chứa E46, K47 và A49 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Epitop của kháng thể này có thể còn chứa F48 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

Định nghĩa về thuật ngữ “paratop” có nguồn gốc từ định nghĩa nêu trên về “epitop” bằng cách đảo ngược cách nhìn. Do đó, thuật ngữ “paratop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khu vực hoặc vùng trên kháng thể mà kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với nó, tức là nó làm cho tiếp xúc vật lý với kháng nguyên này.

Trong bản mô tả này, cấu trúc tinh thể có nguồn gốc từ tia X, được xác định bởi tọa độ không gian của phức hợp giữa kháng thể, như mảnh Fab, và kháng nguyên của nó, thuật ngữ paratop trong bản mô tả này, nếu không có quy định cụ thể hoặc đối lập với sáng chế, được xác định cụ thể là các gốc kháng nguyên được đặc trưng bởi có nguyên tử nặng (tức là nguyên tử không phải hydro) nằm trong khoảng cách là 4Å tính từ nguyên tử nặng trong TREM-1.

Epitop và paratop đối với cặp kháng thể (Ab)/kháng nguyên (Ag) nhất định có thể được nhận diện bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, việc định vị thông thường của epitop có thể được xác định bằng cách đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể với các mảnh hoặc biến thể polypeptit TREM-1 khác nhau. Axit amin đặc hiệu trong TREM-1 tiếp xúc với kháng thể (epitop) và axit amin đặc hiệu trong kháng thể tiếp xúc với TREM-1 (paratop) cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, kháng thể và phân tử đích có thể được kết hợp và phức hợp Ab:Ag có thể được tạo tinh thể. Cấu trúc tinh thể của phức hợp này có thể được xác định và sử dụng để xác định vị trí đặc hiệu của quá trình tương tác giữa kháng thể và đích của nó.

Các kháng thể gắn kết với cùng một kháng nguyên có thể được đặc trưng về khả năng gắn kết của chúng đồng thời với với kháng nguyên thông thường và có thể được gọi là “gắn kết cạnh tranh”/”tạo ngăn”. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tạo ngăn” sử dụng để chỉ phương pháp nhóm các kháng thể gắn kết với cùng một kháng nguyên. “Tạo ngăn” các kháng thể có thể được dựa trên gắn kết cạnh tranh của hai kháng thể với kháng nguyên thông thường của chúng trong các thử nghiệm dựa trên kỹ thuật tiêu chuẩn như cộng hưởng từ bề mặt (SPR), ELISA hoặc phân tích tế bào theo dòng chảy.

“Ngăn” của kháng thể được xác định bằng cách sử dụng kháng thể tham chiếu. Nếu kháng thể thứ hai không gắn kết với gắn kết với kháng nguyên tại cùng thời điểm với kháng thể tham chiếu, thì kháng thể thứ hai này thuộc cùng một “ngăn” với kháng thể tham chiếu này. Trong trường hợp này, kháng thể tham chiếu và kháng thể thứ hai gắn

kết cạnh tranh với cùng một phần kháng nguyên và được xem là “kháng thể cạnh tranh”. Nếu kháng thể thứ hai có khả năng gắn kết với kháng nguyên tại cùng thời điểm với kháng thể tham chiếu, thì kháng thể thứ hai này thuộc “ngăn” riêng biệt. Trong trường hợp này, kháng thể tham chiếu và kháng thể thứ hai không gắn kết cạnh tranh với cùng một phần kháng nguyên và được xem là “kháng thể không cạnh tranh”.

Việc “tạo ngăn” kháng thể không cung cấp trực tiếp thông tin về epitop. Kháng thể cạnh tranh, tức là các kháng thể thuộc cùng một “ngăn” có thể có các epitop giống nhau, epitop chồng lặp hoặc thậm chí là các epitop riêng rẽ. Trong trường hợp sau nếu kháng thể tham chiếu gắn kết với epitop của nó trên kháng nguyên đi vào không gian cần thiết đối với kháng thể thứ hai để tiếp xúc epitop của nó trên kháng nguyên này (“cản trở không gian”). Kháng thể không cạnh tranh thường có các epitop riêng rẽ.

Kháng thể theo sáng chế có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 0170 để gắn kết với TREM-1 của người. Kháng thể theo sáng chế có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 0170 để gắn kết với TREM-1 của khỉ đuôi dài. Mặt khác, kháng thể theo sáng chế có thể thuộc cùng một “ngăn” với kháng thể đơn dòng 0170.

Thuật ngữ “ái lực gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc xác định độ mạnh của quá trình tương tác không cộng hóa trị giữa hai phân tử, ví dụ, kháng thể, hoặc mảnh của chúng, và kháng nguyên. Thuật ngữ “ái lực gắn kết” được sử dụng để mô tả quá trình tương tác hoá trị một (hoạt tính nội tại).

Ái lực gắn kết giữa hai phân tử, ví dụ, kháng thể, hoặc mảnh của chúng, và kháng nguyên, thông qua quá trình tương tác hoá trị một có thể được xác định bằng cách đo hằng số phân ly cân bằng (K_D). Tiếp theo, K_D có thể được xác định bằng cách đo động học của việc tạo ra và phân ly phức hợp, ví dụ, bằng phương pháp SPR. Hằng số tốc độ tương ứng với quá trình liên kết và phân ly phức hợp hoá trị một lần lượt được gọi là hằng số tốc độ liên kết k_a (hoặc k_{on}) và hằng số tốc độ phân ly k_d (hoặc k_{off}). K_D có liên quan đến k_a và k_d thông qua đẳng thức $K_D = k_d / k_a$.

Bằng cách định nghĩa nêu trên, ái lực gắn kết có liên quan tới sự tương tác phân tử khác nhau, như so sánh ái lực gắn kết của kháng thể khác nhau đối với kháng nguyên nhất định, có thể được so sánh bằng cách so sánh trị số K_D đối với phức hợp kháng thể/kháng nguyên nhất định.

Kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết TREM-1 của người với ái lực (K_D) là 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn hoặc 1×10^{-13} M hoặc nhỏ hơn, như được xác định bằng cách sử dụng cộng hưởng từ bề mặt. Kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết với TREM-1 của khỉ đuôi dài với ái lực (K_D) là 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn hoặc 1×10^{-13} M hoặc nhỏ hơn, như được xác định bằng cách sử dụng cộng hưởng từ bề mặt.

Thuật ngữ “độ đặc hiệu gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình tương tác của phân tử như kháng thể, hoặc mảnh của chúng, với kháng nguyên duy nhất đơn lẻ, hoặc với số lượng giới hạn kháng nguyên đồng nhất ở mức cao (hoặc epitop). Trái lại, các kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với TREM-1 không có khả năng gắn kết phân tử không cùng loại. Các kháng thể theo sáng chế không thể có khả năng gắn kết với Nkp44, protein liên quan tới tế bào tiêu diệt tự nhiên p44.

Độ đặc hiệu của quá trình tương tác và trị số của hằng số gắn kết cân bằng có thể được xác định trực tiếp bằng các phương pháp đã biết. Các thử nghiệm tiêu chuẩn để đánh giá khả năng gắn kết của phối tử (như các kháng thể) với đích của chúng là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, ELISA, thăm Tây, RIA, và phân tích tế bào theo dòng chảy. Động học gắn kết và ái lực gắn kết của kháng thể cũng có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như SPR.

Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh có thể được thực hiện trong đó quá trình gắn kết của kháng thể với đích được so sánh với quá trình gắn kết của đích bởi phối tử khác của đích đó, như kháng thể khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm và sản phẩm chứa phân tử theo sáng chế, như kháng thể TREM-1, polynucleotit, vector và tế bào được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể TREM-1 theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang được dụng.

Do đó, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa kháng thể TREM-1 này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,25mg/mL đến 250mg/mL, như nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 200mg/mL, và trong đó được phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 10,0,

như độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0. Dược phẩm này có thể còn chứa một hoặc nhiều hệ đệm, chất bảo quản, chất đẳng trương, chất càn hóa, chất ổn định và/hoặc chất hoạt động bề mặt, cũng như tổ hợp khác nhau của chúng. Việc sử dụng chất bảo quản, chất đẳng trương, chất càn hóa, chất ổn định và chất hoạt động bề mặt trong dược phẩm là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Tài liệu viện dẫn có thể là tài liệu của Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Theo một phương án, dược phẩm là dược phẩm dạng nước. Dược phẩm này thường là dung dịch hoặc hỗn dịch, nhưng cũng có thể là thể keo, thể phân tán, nhũ tương, và thể nhiều pha. Thuật ngữ “dược phẩm dạng nước” được xác định là dược phẩm chứa ít nhất 50% khối lượng nước. Tương tự, thuật ngữ “dung dịch nước” được xác định là dung dịch chứa ít nhất 50% khối lượng nước, và thuật ngữ “hỗn dịch nước” được xác định là hỗn dịch chứa ít nhất 50% khối lượng nước.

Theo phương án khác, dược phẩm là dược phẩm đông khô, mà nhân viên y tế hoặc đối tượng bị bệnh bổ sung dung môi và/hoặc chất pha loãng trước khi sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm chứa dung dịch nước của kháng thể này, và dung dịch đệm, trong đó kháng thể này ở nồng độ khoảng 1mg/mL hoặc lớn hơn, và trong đó dược phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 10,0, như độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0.

Kháng thể TREM-1 theo sáng chế và dược phẩm chứa các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm như các bệnh sau: bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét ruột kết mãn tính, hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh khớp vẩy nến, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận do luput, bệnh đái tháo đường typ I, bệnh Grave, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm cơ tim tự miễn, bệnh Kawasaki, bệnh động mạch vành, bệnh tắc nghẽn đường phổi mạn tính, bệnh phổi tế bào kẽ, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh xơ cứng bì, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm da dị ứng, bệnh bạch biến, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng Sjogrens, bệnh viêm thận tự miễn, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa dây thần kinh khử myelin, bệnh dị ứng, bệnh hen và các bệnh tự miễn khác gây ra chứng viêm cấp tính hoặc mạn tính.

Các kháng thể TREM-1 theo sáng chế có thể là thích hợp để sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh viêm ruột. Bệnh viêm ruột là bệnh có thể ảnh hưởng đến một phần bất kỳ của đường dạ dày-ruột từ miệng to hậu môn, gây ra nhiều triệu chứng. Bệnh viêm ruột chủ yếu gây ra chứng đau bụng, bệnh tiêu chảy (có thể chảy máu), nôn hoặc sút cân, nhưng cũng có thể gây ra các biến chứng bên ngoài đường dạ dày-ruột như chứng phát ban trên da, bệnh khớp, bệnh viêm mắt, mệt mỏi và giảm tập trung. Đối tượng bị bệnh viêm ruột có thể được chia thành hai nhóm chính, nhóm bị bệnh viêm loét ruột kết mãn tính và nhóm bị bệnh Crohn. Thông thường, bệnh Crohn liên quan đến ruột hồi và ruột kết, nó có thể ảnh hưởng đến vùng ruột bất kỳ nhưng thường không liên tục (các vùng trung tâm của bệnh lan ra khắp ruột). Bệnh viêm loét ruột kết mãn tính thường liên quan đến trực tràng (ruột kết) và xuất hiện liên tục hơn. Ở bệnh Crohn, chứng viêm thường xuyên qua thành ruột, dẫn đến áp-xe, rò và hẹp, trong khi đó ở bệnh viêm loét ruột kết mãn tính, chứng viêm thường chỉ giới hạn ở niêm mạc. Không có được phẩm hoặc việc điều trị bằng phẫu thuật đối với bệnh Crohn, trong khi đó một vài đối tượng bị bệnh viêm loét ruột kết mãn tính có thể được trị bằng cách phẫu thuật cắt ruột kết. Lựa chọn điều trị bị giới hạn ở việc kiểm soát triệu chứng, duy trì sự miễn giảm và phòng tái phát. Hiệu quả ở bệnh viêm ruột trên lâm sàng có thể được xác định bằng cách giảm chỉ số hoạt động của bệnh Crohn (CDAI) đối với CD được đánh số trên thang điểm dựa vào các thử nghiệm trong phòng thử nghiệm và bảng câu hỏi về chất lượng cuộc sống. Ở mô hình động vật, hiệu quả được xác định phổ biến nhất bởi sự tăng trọng lượng cũng như chỉ số hoạt động của bệnh (DAI), là sự kết hợp của độ đặc của phân, trọng lượng và máu trong phân.

Các kháng thể TREM-1 theo sáng chế có thể là thích hợp để sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh viêm khớp dạng thấp. Bệnh viêm khớp dạng thấp là bệnh toàn thân ảnh hưởng một phần chứ không phải toàn bộ cơ thể và là một trong số các dạng phổ biến nhất của bệnh khớp. Nó được đặc trưng bởi chứng viêm ở khớp, gây đau, cứng, nóng, đỏ và sưng. Bệnh viêm là hậu quả của các tế bào viêm lan tỏa tới các khớp, và các tế bào viêm này giải phóng enzym có thể làm tiêu xương và sụn. Do đó, bệnh viêm này có thể làm tổn thương xương và sụn một cách nghiêm trọng và làm phá hủy khớp và gây đau trầm trọng, không kể các ảnh hưởng sinh lý học khác. Khớp liên quan có thể bị biến dạng và duỗi thẳng, dẫn đến đau và giảm khả năng di chuyển.

Có một vài mô hình động vật bị bệnh viêm khớp dạng thấp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, trong mô hình bệnh khớp liên quan đến collagen (CIA), chuột nhắt bị bệnh viêm khớp tương tự như bệnh viêm khớp dạng thấp người. Do CIA đều có các dấu hiệu miễn dịch và bệnh lý tương tự như RA, nên đây là mô hình thích hợp để sàng lọc các hợp chất chống viêm tiềm năng ở người. Hiệu quả ở mô hình này được xác định bởi mức giảm sưng ở khớp. Hiệu quả ở bệnh RA trên lâm sàng được xác định bằng khả năng làm giảm triệu chứng ở đối tượng bị bệnh mà đã được xác định bằng việc kết hợp của mức độ sưng khớp, tốc độ lắng hồng cầu, nồng độ protein hoạt tính C và nồng độ của các yếu tố trong huyết thanh, như kháng thể protein kháng xitruilin.

Các kháng thể TREM-1 theo sáng chế có thể là thích hợp để sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh vẩy nến. Bệnh vẩy nến là rối loạn viêm gây ra bởi tế bào T trên da, có thể gây khó chịu đáng kể. Nó là bệnh mà hiện nay chưa có phương pháp chữa trị và nó ảnh hưởng ở mọi độ tuổi. Mặc dù các đối tượng mắc bệnh vẩy nến nhẹ có thể thường kiểm soát được bệnh bằng các thuốc dùng tại chỗ, nhưng hơn một triệu đối tượng bị bệnh trên toàn thế giới vẫn cần điều trị bằng tia cực tím hoặc trị liệu ức chế miễn dịch toàn thân. Đáng tiếc là, sự bất tiện và nguy cơ của bức xạ tia cực tím và độc tính của nhiều phương pháp điều trị làm giới hạn việc sử dụng chúng trong thời gian dài. Hơn nữa, đối tượng bị bệnh thường bị tái phát bệnh vẩy nến, và trong một số trường hợp bị phản ứng nhẹ sau khi ngừng trị liệu bằng cách ức chế miễn dịch. Mô hình về bệnh vẩy nến gần đây đã được phát triển dựa trên việc chuyển tế bào CD4⁺ T giống như bệnh vẩy nến ở người và do đó có thể được sử dụng để xác định hợp chất thích hợp để sử dụng trong điều trị bệnh vẩy nến (Davenport et al., *Internat. Immunopharmacol* 2:653-672, 2002). Hiệu quả trong mô hình này được xác định bằng mức thuyên giảm bệnh trên da bằng cách sử dụng hệ thống ghi điểm. Tương tự, hiệu quả ở đối tượng bị bệnh được xác định bằng mức thuyên giảm bệnh trên da.

Các kháng thể TREM-1 theo sáng chế có thể là thích hợp để sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh khớp vẩy nến. Bệnh khớp vẩy nến (PA) là loại bệnh viêm khớp xuất hiện ở một nhóm đối tượng bị bệnh vẩy nến. Ở các đối tượng bị bệnh này, bệnh học/triệu chứng trên da thường đi kèm với sự sưng khớp tương tự như triệu chứng xuất hiện ở bệnh viêm khớp dạng thấp. Nó đặc trưng ở các vùng không đều, tăng dần, độ của chứng viêm da kèm theo tróc vảy. Bệnh vẩy nến thường ảnh hưởng đến các đầu

khuyết tay và đầu gối, da đầu, rốn và quanh bộ phận sinh dục hoặc hậu môn. Khoảng 10% đối tượng bị bệnh bị bệnh vảy nến cũng bị các chứng viêm liên quan ở các khớp của chúng.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình điều trị bệnh cho người bất kỳ hoặc động vật khác có nhu cầu cần điều trị. Dự định rằng đối tượng này cần phải được khám sức khỏe bởi nhân viên y tế hoặc bác sĩ thú y, là người đưa ra chẩn đoán tạm thời hoặc chẩn đoán chính thức có thể chỉ ra rằng việc sử dụng việc điều trị này là thích hợp cho sức khỏe của người hoặc động vật khác. Thời gian và mục đích của việc điều trị này có thể thay đổi ở các đối tượng khác nhau, theo nhiều yếu tố, như tình trạng sức khỏe hiện tại của đối tượng. Do đó, việc điều trị này có thể là phòng ngừa, giảm đau, triệu chứng và/hoặc chữa trị.

Theo sáng chế, việc phòng ngừa, giảm đau, triệu chứng và/hoặc chữa trị có thể thể hiện các khía cạnh riêng rẽ của sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, như đường tiêm tĩnh mạch, như đường tiêm bắp, như đường tiêm dưới da. Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng không phải ngoài đường tiêu hóa, như qua đường miệng hoặc khu trú. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngừa. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị (theo yêu cầu).

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, nhận thấy việc thể các gốc mang điện tích âm của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 (chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể đơn dòng 0170) ảnh hưởng đến độ nhót của kháng thể đơn dòng. Theo khía cạnh thứ nhất này của sáng chế, kháng thể đơn dòng theo sáng chế là biến thể của kháng thể đơn dòng 0170 có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng 0170, tức là trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, chứa các thể đột biến trong đó các gốc mang điện tích âm trong vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng các gốc không mang điện tích. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể đơn dòng 0170 bao gồm việc thể gốc bất kỳ hoặc kết hợp các gốc bất kỳ trong số các gốc D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 với gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Như được chỉ

định theo cách khác, phương án quan tâm của sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 (hoặc biến thể của nó) như chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 trong đó gốc bất kỳ hoặc kết hợp các gốc bất kỳ trong số các gốc D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Các thể đột biến này được gọi là các thể đột biến dạng “mảng điện tích”. Theo phương án được ưu tiên, ít nhất một hoặc cả hai E27 lẫn E97 của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thế bằng các gốc axit amin không mang điện tích, như axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. theo phương án được ưu tiên, E27 của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành glutamin và E97 được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin. Theo phương án khác, E27 vẫn không được tạo đột biến và E97 được tạo đột biến bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin. Theo phương án khác, gốc E97 không được tạo đột biến và E27 được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin, tốt hơn nữa nếu bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm serin và glutamin.

Khía cạnh khác theo sáng chế là dựa vào sự quan sát rằng đime Fab-Fab được tạo ra do sự tương tác trong vùng paratop. So mAb chứa hai Fab, nên nhận thấy rằng mAb có thể được multimer hóa, có thể ảnh hưởng đến các đặc tính về độ nhớt. Do đó, khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến gốc đột biến trong vùng tương tác Fab-Fab của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 (tức là trong vùng chuỗi nặng biến đổi của kháng thể đơn dòng 0170) để khử quá trình đime hóa Fab-Fab. Các thể đột biến này được gọi là các thể đột biến “tương tác Fab-Fab”. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc thế một gốc bất kỳ trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 3 bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin,

serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin. Như được chỉ định theo cách khác, phương án quan tâm của sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó một gốc bất kỳ trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 3 (thể đột biến “tương tác Fab-Fab”) được thể bằng axit amin khác, như axit amin tự nhiên, tốt hơn nếu gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin. Tốt hơn, nếu ít nhất một trong số các gốc A59 và N57 SEQ ID NO.2 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin. theo một phương án, A59 không được tạo đột biến và N57 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin. Theo phương án khác, N57 không được tạo đột biến và A59 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin. Theo ít nhất một phương án, cả A59 lẫn N57 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin.

Theo phương án quan tâm, i) ít nhất một gốc mang điện tích âm của các vùng CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin và ii) ít nhất một gốc trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 3 (thể đột biến “tương tác Fab-Fab”) được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, và tryptophan, histidin và tyrosin.

Theo phương án thích hợp, một hoặc cả hai E27 lẫn E97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm

glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin và một hoặc cả hai A59 lẫn N57 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 được tạo đột biến thành gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin, tốt hơn nữa nếu serin hoặc tyrosin.

Khía cạnh khác theo sáng chế được dựa trên sự quan sát rằng việc thế Ala ở vị trí Y90 của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 1 của TREM-1 sẽ cải thiện được ái lực của trình tự nêu trong SEQ. ID NO 3 đối với TREM-1. Nhận thấy rằng Y90 tương tác với gốc phenylalanin của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3. Việc tạo đột biến của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 để cải thiện sự tương tác Fab-TREM-1 được gọi là các thể đột biến tương tác Fab-TREM-1. Theo một phương án của khía cạnh này của sáng chế, phenylalanin ở vị trí 32 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành axit amin được chọn từ các gốc axit amin glyxin, serin, threonin, xystein, alanin, valin, leuxin, isoleuxin và metionin, tốt hơn nữa được chọn từ alanin, glyxin, serin valin và leuxin. Theo phương án quan tâm, F32 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành alanin hoặc serin.

Các thể đột biến dạng mảng điện tích trong CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 làm giảm bán kính thủy động (Rh), đồng thời các thể đột biến trong vùng tương tác Fab-Fab được tăng lên Rh (Fig. 6). Các thể đột biến ở vị trí “tương tác Fab-TREM-1” không ảnh hưởng đến Rh và ảnh hưởng rất ít tới độ nhớt (Fig. 6 và Fig.1, Bảng 3C và 3E).

Bảng 1: Mô tả khái quát các biến thể kháng thể đơn dòng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.(0170) được tạo ra. L = chuỗi nhẹ, H = chuỗi nặng.

	Kháng thể đơn dòng	Trình tự	Thể đột biến với SEQ ID NO.2 hoặc 3	Chuỗi
Thể đột biến dạng mảng điện tích	0317	SEQ ID NO.4 và 2	E27Q, E97S	L
	0318	SEQ ID NO.5 và 2	E27Q, E97Q	L
	0319	SEQ ID NO.6 và 2	E97S	L
	0320	SEQ ID NO.7 và 2	E97Q	L
	0321	SEQ ID NO.8 và 2	E27Q	L
Thể đột biến tương tác Fab- Fab	0324	SEQ ID NO.11 và 3	A59Y	H
	0325	SEQ ID NO.12 và 3	N57S	H
	0326	SEQ ID NO.13 và 3	A59Y, N57S	H
Thể đột biến tương tác Fab- TREM-1	0322	SEQ ID NO.9 và 2	F32A	L
	0323	SEQ ID NO.10 và 2	F32S	L

Thế đột biến dạng mảng điện tích và thế đột biến tương tác Fab-TREM-1	0330	SEQ ID NO.14 và 2	F32A, E27Q, E97Q	L
	0332	SEQ ID NO.: 15 và 5	A59Y/E27Q, E97Q	H/L
	0333	SEQ ID NO.14 và 16	A59Y/F32A, E27Q, E97Q	H/L

Độ nhớt được xác định đối với các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 bằng cách lưu biến DLS hoặc vi lưu biến và nhận thấy rằng cả thế đột biến dạng “mảng điện tích” lẫn thế đột biến “tương tác Fab-Fab” đều làm giảm độ nhớt. Nhận thấy biến thể kháng thể đơn dòng 0318, bao gồm các thế đột biến dạng mảng điện tích E27Q và E97Q có độ nhớt thấp nhất.

Động học gắn kết của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 hướng đích TREM-1-Fc của người và TREM-1-Fc của khí đuôi dài lần lượt được xác định. Nhận thấy tất cả các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 có ái lực tương tự hướng đích TREM-1-Fc của người. Đáng quan tâm là, nhận thấy biến thể kháng thể đơn dòng, SEQ ID NO.9 chứa thế đột biến “tương tác Fab-TREM-1” có ái lực gia tăng hướng đích TREM-1-Fc của khí đuôi dài (Bảng 2).

Bảng 2: Ái lực của các biến thể kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 lần lượt hướng đích TREM-1-Fc của người và TREM-1-Fc của khí đuôi dài.

TREM-1-Fc của người				TREM-1-Fc của khí đuôi dài		
Kháng thể đơn dòng	ka (1/mili giây)	kd (1/giây)	KD (nM)	ka (1/mili giây)	kd (1/giây)	KD (nM)
0170	3E+06	5E-04	0,1	0,3E+06	4E-04	2
0317	4E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	7E-04	3
0318	3E+06	7E-04	0,2	0,3E+06	7E-04	2
0319	4E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	6E-04	2
0320	4E+06	7E-04	0,2	0,2E+06	6E-04	3
0321	3E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	6E-04	2
0322	3E+06	3E-04	0,1	0,6E+06	1E-04	0,1
0323	2E+06	6E-04	0,3	0,4E+06	2E-04	0,6
0324	3E+06	8E-04	0,3	0,2E+06	6E-04	4
0325	4E+06	3E-04	0,08	0,2E+06	6E-04	1
0326	3E+06	7E-04	0,2	0,2E+06	3E-04	5
0330	2E+06	3E-04	0,1	0,6E+06	7E-05	0,1
0332	3E+06	1E-03	0,4	0,2E+06	8E-04	4
0333	2E+06	5E-04	0,3	0,4E+06	1E-04	0,3

Theo một phương án về ái lực cải thiện hướng đích TREM-1 và có độ nhớt thấp, các thế đột biến từ SEQ ID NO.9 được kết hợp với các thế đột biến trong SEQ ID NO.5 để tạo ra chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO.14 và các thế đột biến từ chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO.14

được kết hợp tiếp với các thể đột biến chuỗi nặng từ SEQ ID NO.16. Ái lực gia tăng hướng đích TREM-1-Fc của khi đuôi dài được duy trì đối với các biến thể kháng thể đơn dòng chứa các thể đột biến kết hợp của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và các thể đột biến không ảnh hưởng tiêu cực tới ái lực hướng đích TREM-1-Fc của người. Do đó, các phương án bao gồm các thể đột biến dạng “mảng điện tích” lẫn thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1” được dự tính trong sáng chế, cũng như các phương án kể cả các thể đột biến dạng “mảng điện tích” lẫn các thể đột biến “tương tác Fab-Fab” cũng như các phương án kể cả thể đột biến “tương tác Fab-Fab” lẫn thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1” và các phương án bao gồm thể đột biến “tương tác Fab-Fab”, thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1” và thể đột biến dạng “mảng điện tích”.

Bảng 3A: Độ nhót theo nồng độ protein của kháng thể đơn dòng 0170, 0317 và 0318

Kháng thể đơn dòng					
0170		0317		0318	
Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)
100,0	26,0	85,0	2,9	85,0	1,9
80,0	14,5	63,8	2,2	63,8	1,9
60,0	6,0	42,5	1,9	42,5	2,0
40,0	3,1	17,0	1,3	17,0	1,2
20,0	1,6	10,2	1,2	10,2	1,2
12,0	1,3	3,4	1,1	3,4	1,2
4,0	1,1	0,0	1,0	0,0	1,0
0,0	0,9				

Bảng 3B: Độ nhót theo nồng độ protein của kháng thể đơn dòng 0319 và 0320 và 321.

Kháng thể đơn dòng					
0319		0320		0321	
Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhót (cP)
85,0	2,2	107,0	7,8	106,0	5,9
63,8	2,3	80,3	3,7	79,5	3,0
42,5	2,0	53,5	2,5	53,0	2,0
17,0	1,2	26,8	1,6	26,5	1,6
10,2	1,1	13,4	1,3	13,3	1,2
3,4	1,1	6,7	1,2	6,6	1,1

0,0	1,0	3,3	1,1	3,3	1,1
		0,0	1,0	0,0	0,9

Bảng 3C: Độ nhớt theo nồng độ protein của kháng thể đơn dòng 0322, 0323 và 0324.

Kháng thể đơn dòng					
0322		0323		0324	
Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)	Nồng độ Protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)
100,0	16,4	101,0	21,3	103,0	5,4
75,0	4,9	75,8	11,3	77,3	3,1
50,0	3,3	50,5	3,7	51,5	2,2
25,0	2,0	25,3	2,6	25,8	1,6
12,5	1,6	12,6	2,0	12,9	1,4
6,3	1,4	6,3	1,4	6,4	1,3
3,1	1,3	3,2	1,2	3,2	1,2
0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,9

Bảng 3D: Độ nhớt theo nồng độ protein của kháng thể đơn dòng 0325, 0326 và 0330.

Kháng thể đơn dòng					
0325		0326		0330	
Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)
95,0	7,8	109,0	7,5	104,5	3,8
71,3	3,7	81,8	3,1	50,5	2,1
47,5	2,3	54,5	2,2	23,9	1,4
23,8	1,6	27,3	1,6	9,4	1,3
11,9	1,3	6,8	1,5	4,7	1,1
5,9	1,3	3,4	1,1	1,9	1,1
3,0	1,2	0,0	0,9	1,0	1,3
0,0	1,0				

Bảng 3E Độ nhớt theo nồng độ protein của kháng thể đơn dòng 0332 và 0333.

Kháng thể đơn dòng			
0332		0333	
Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)	Nồng độ Protein (mg/mL)	Độ nhớt (cP)
114,1	5,9	113,2	5,2
53,6	2,1	47,1	2,1
22,2	2,2	24,9	2,0
9,0	2,2	9,0	1,8

4,6	1,8	4,5	1,5
1,9	1,2	1,8	1,6
1,1	1,1	0,9	1,4

Sáng chế cũng đề cập đến các phương án không giới hạn sau:

1. Kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết và phong bế TREM-1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, khác biệt ở chỗ kháng thể này, hoặc mảnh của nó, có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP ở nồng độ 50mg/mL, như nhỏ hơn 4 cP, tốt hơn nếu nhỏ hơn 3 cP (trong đó phương pháp xác định độ nhớt theo các điều kiện về nồng độ protein bằng thông thường hoặc như được nêu trong bản mô tả này.)

2. Kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết và phong bế TREM-1, khác biệt ở chỗ kháng thể này, hoặc mảnh của nó, có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP ở nồng độ bằng 80mg/mL, tốt hơn nếu nhỏ hơn 4 cP (trong đó phương pháp xác định độ nhớt theo các điều kiện về nồng độ protein bằng thông thường hoặc như được nêu trong bản mô tả này.)

3. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo các phương án 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này hoặc mảnh của nó phong bế chức năng của TREM-1 với KD đối với SEQ ID NO.1 là nhỏ hơn 0,5 nM, như nhỏ hơn 0,4 nM, tốt hơn nếu of 0,3 nM hoặc nhỏ hơn.

4. Kháng thể hoặc mảnh của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh của nó gắn kết cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 0170 để gắn kết với SEQ ID NO.1 và có đặc tính độ nhớt sao cho:

(a) kháng thể này hoặc mảnh của nó có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP ở nồng độ 50mg/mL, như nhỏ hơn 4 cP, tốt hơn nếu nhỏ hơn 3 cP ; hoặc

(b) kháng thể này hoặc mảnh của nó, có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP ở nồng độ bằng 80mg/mL, tốt hơn nếu nhỏ hơn 4 cP.

5. Kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết đặc hiệu và phong bế TREM-1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh của nó có các thể đột biến “tương tác Fab-Fab” có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

6. Kháng thể hoặc mảnh của nó có khả năng gắn kết đặc hiệu và phong bế TREM-1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh của nó có các thể đột biến dạng “mảng điện tích”, như trong đó ít nhất một trong số gốc mạng điện

tích âm của CDR1 và CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng các gốc không mang điện tích.

7. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, trong đó axit amin mang điện tích âm được thể bằng các gốc axit amin có thể tạo ra phần gắn kết với hydro, như tạo đột biến gốc Asp hoặc Glu với gốc bất kỳ trong số các gốc Asn, Gln, Ser và Thr.

8. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế có độ nhớt thấp hơn so với kháng thể đơn dòng 0170, nhưng vẫn có KD đối với SEQ ID NO.1 of nhỏ hơn 0,5 nM.

9. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế có độ nhớt thấp hơn so với kháng thể đơn dòng 0170, KD đối với SEQ ID NO.1 là nhỏ hơn 0,5 nM và KD đối với SEQ ID NO.17 là nhỏ hơn 0,6 nM, bằng cách thể axit amin không mang điện tích của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và/hoặc 3, có liên quan trong quá trình “tương tác Fab-Fab” với axit amin có vị trí hoặc khả năng gắn kết với hydro thay đổi.

10. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế có khả năng gắn kết đặc hiệu và phong bế TREM-1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 và chứa các biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 hoặc cả hai trình tự này, trong đó các biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm các thể đột biến “tương tác Fab-Fab”, thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1” và thể đột biến dạng “mạng điện tích” có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3.

11. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế chứa thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1”, như trong đó gốc Phe của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được thể bằng Ala hoặc Ser.

12. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế mà cạnh tranh với SEQ ID NO.2 hoặc 3 để gắn kết với SEQ ID NO.1 và có epitop chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tất cả các gốc axit amin D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 và L45 và một, hai hoặc tất cả các gốc axit amin E46, K47, F48 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

13. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế, mà cạnh tranh gắn kết với SEQ ID NO.3, và chứa LC có một hoặc cả hai gốc glutamat (E) ở các vị trí 27 và 97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành serin (S) hoặc glutamin (Q), như trong đó E27Q, E97S, như trong đó cả hai E27 lẫn E97 được tạo đột biến thành glutamin hoặc trong đó E27 không được tạo đột biến và E97 được tạo đột biến thành S (E27, E97S), hoặc trong đó E27 không được tạo đột biến và E97 được tạo đột biến thành Q (E27, E97Q), hoặc trong đó E97 không được tạo đột biến và E27 được tạo đột biến thành Q hoặc S, tốt hơn nữa nếu thành Q (E27, E97Q).

14. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó phenylalanin ở vị trí 32 (F32) được tạo đột biến, như được biến đổi thành A (kháng thể đơn dòng 0322) hoặc thành S (kháng thể đơn dòng 0323).

15. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án, chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 trong đó một hoặc cả hai gốc N57 lẫn gốc A59 được tạo đột biến, như trong đó gốc A59 được tạo đột biến thành tyrosin, hoặc trong đó gốc N57 được tạo đột biến thành serin, hoặc trong đó gốc N57 được tạo đột biến thành serin và gốc A59 được tạo đột biến thành tyrosin.

16. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, trong đó axit amin không mang điện tích có liên quan đến quá trình tương tác Fab-Fab đặc hiệu được thế bằng axit amin có kích cỡ hoặc khả năng gắn kết với hydro thay đổi, như trong đó alanin (A) hoặc asparagin (N) được thế bằng bất kỳ một trong số Ser, Thr, Phe, Tyr và Trp.

17. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và cạnh tranh gắn kết với SEQ ID NO.3, trong đó một hoặc cả hai gốc glutamat (E) ở các vị trí 27 và 97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 được tạo đột biến thành serin (S) hoặc glutamin (Q), như trong đó cả hai E27 và E97 được tạo đột biến thành glutamin (318), hoặc trong đó E27 không được tạo đột biến và E97 được tạo đột biến thành S (E27, E97S), hoặc trong đó E27 không được tạo đột biến và E97 được tạo đột biến

biến thành Q (E27, E97Q), hoặc trong đó E97 không được tạo đột biến và E27 được tạo đột biến thành Q hoặc S, tốt hơn nữa nếu thành Q (E27, E97Q).

18. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và cạnh tranh gắn kết với SEQ ID NO.2, trong đó một hoặc cả hai gốc N57 và gốc A59 được tạo đột biến, như trong đó gốc A59 được tạo đột biến thành tyrosin, hoặc trong đó gốc N57 được tạo đột biến thành serin, hoặc trong đó cả hai gốc N57 được tạo đột biến thành serin và gốc A59 được tạo đột biến thành tyrosin.

19. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4.

20. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

21. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

22. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7.

23. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8.

24. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

25. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

26. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11.

27. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.12.

28. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13.

29. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14.

30. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15.

31. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16.

32. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự bất kỳ một trong số các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 đến 16.

33. Chế phẩm chứa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32.

34. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32 để sử dụng làm thuốc.

35. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32 sử dụng để điều trị bệnh được chọn từ bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn.

36. Kháng thể theo phương án 35, trong đó bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm ruột.

37. Sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, để sản xuất thuốc điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn.

38. Sử dụng theo phương án 37, trong đó bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm ruột.

39. Phương pháp điều trị bệnh được chọn từ bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn bao gồm bước sử dụng kháng thể theo sáng chế (như kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32), chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế, hoặc thuốc chứa kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Bán kính thủy động và độ nhớt của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170

Nhận thấy bán kính thủy động của kháng thể đơn dòng 0170 trong WO2013/120553 là cao hơn (9-10 nm) so với mong muốn (5-6 nm). Bán kính thủy động được xác định bằng cách phân tích động lực tán xạ ánh sáng có sử dụng đĩa 96 giếng có trang bị máy đọc đĩa DynaPro (Wyatt Inc.). Các đĩa sử dụng là các đĩa thử nghiệm Corning 3540 (Corning). Tổng thể tích mẫu khoảng 20 μ L và nhiệt độ được duy trì ở 25°C đối với các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 (Fig.6).

Các thể đột biến dạng mảng điện tích trong CDR1 và CDR3 của chuỗi nhẹ biến đổi làm giảm Rh xuống nồng độ mong muốn đối với các kháng thể đơn dòng monomer, đồng thời các thể đột biến trong vùng tương tác Fab-Fab được coi là làm tăng Rh. Các thể đột biến ở vị trí tương tác Fab-TREM-1 không làm ảnh hưởng đến Rh.

Độ nhớt được xác định đối với các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 0317, 0318, 0319, 0320, 0321, 0322, 0323, 0324, 0325, 0326 và 0330 bằng DLS. Bán kính thủy động được xác định trên máy đọc đĩa Wyatt DynaPro có sử dụng vi đĩa polystyren không được xử lý, màu đen, đáy trong suốt Corning 3540 và hình cầu cỡ nano polystyren tròn do

Phosphorex Inc. cung cấp có đường kính trung bình là 206,5 nm (mã sản phẩm 106). Mẫu protein được chuyển vào đĩa Corning 3540 và đặt bằng nắp ở đỉnh. Các mẫu này được ly tâm và bán kính thủy động của mẫu protein này được xác định trong máy đọc đĩa Wyatt DynaPro DLS. Mỗi giếng được bổ sung 0,5 μ L hạt polystyren và được trộn nhẹ bằng pipet. Đĩa này được ly tâm lại và bán kính thủy động của các hạt này được xác định trong máy đọc đĩa Wyatt DynaPro DLS.

Độ nhớt của mẫu protein được tính toán như sau

độ nhớt(protein) = (bán kính thủy động(hạt, đơn vị đo) $\times$ độ nhớt(dung dịch đậm))/bán kính thủy động (hạt, trị số thực)

trong đó độ nhớt (protein) là độ nhớt tính được của dung dịch protein, bán kính thủy động(hạt, đơn vị đo) là bán kính thủy động xác định được của hạt polystyren trong dung dịch protein, độ nhớt (dung dịch đậm) là độ nhớt của dung dịch đậm và bán kính thủy động(hạt, trị số thực) là đường kính trung bình thực của các hạt này [He et al., Anal Biochem, 399, 141-143, 2010].

Độ nhớt được xác định bằng cách phân tích vi lưu biến đối với các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 0332 và 0333. Để phân tích lưu biến, bơm tiêm 250 μ L Hamilton LT (Hamilton-Bonaduz Inc) với kim tiêm 30G Novofine gắn vào được sử dụng. Bơm tiêm này được đặt trên giá đỡ bằng nhôm tùy chỉnh được kẹp chặt với nền. Pittông trụ của bơm tiêm được sử dụng do TAXTPlus Texture Analyzer cung cấp, đo lực thu được pittông trụ này với tốc độ tiêm đã được xác định trước. Mỗi mẫu được thử nghiệm với ba tốc độ tiêm khác nhau. Tốc độ đầu trượt và lực đo được được sử dụng để lần lượt tính toán tốc độ dịch chuyển và ứng suất cắt. Độ nhớt có thể được thể hiện liên quan tới tốc độ dịch chuyển như sau:

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

trong đó η_{protein} là độ nhớt của dung dịch protein, γ là tốc độ dịch chuyển biểu kiến, τ_w là ứng suất cắt, P là áp suất thu được từ lúc di chuyển pittông trụ, Q là tốc độ chảy theo thể tích của dịch lỏng đi qua kim tiêm mao quản và D và L là đường kính trong và chiều dài, tương ứng của mao quản (Allahham et al., 2004; Intl J Pharm 270, 139-148). Độ nhớt, η_{protein} được tính toán từ các trị số đã biết D , L và Q và trị số đo được P .

Phân tích này chỉ ra rằng cả hai thể đột biến dạng “mảng điện tích” lẫn thể đột biến “tương tác Fab-Fab” đều làm giảm độ nhót (Fig.1). Nhận thấy rằng biến thể kháng thể đơn dòng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, bao gồm các thể đột biến dạng mảng điện tích E27Q và E97Q có độ nhót thấp nhất.

Ví dụ 2: Động học của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170

Động học gắn kết của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 hướng đích TREM-1-Fc của người và TREM-1-Fc của khỉ đuôi dài lần lượt được xác định. Nghiên cứu về khả năng gắn kết được thực hiện trên máy phân tích ProteOn Analyzer (BioRad) xác định sự tương tác của phân tử theo thời gian thực bằng cách cộng hưởng từ bề mặt. Các thử nghiệm được tiến hành ở 25°C và các mẫu được bảo quản ở 15°C trong ngăn đựng mẫu. Tín hiệu (RU, đơn vị đáp ứng) được thông báo bởi ProteOn có liên quan mật thiết đến khối lượng trên bề mặt chip cảm ứng riêng rẽ ở sáu dòng tế bào song song nhau. Kháng thể đơn dòng Fc kháng người hoặc đa dòng Fc kháng loài gặm nhấm từ kit bắt giữ Fc của người hoặc của chuột nhắt Biacore được bất động theo hướng nằm ngang trên các dòng tế bào của chip cảm ứng GLM theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ bất động cuối cùng của kháng thể bắt giữ là khoảng 2600-6000 RU trong mỗi thử nghiệm. Quá trình bắt giữ kháng thể kháng hTREM-1 được biểu hiện tái tổ hợp hoặc đơn dòng của chuột đã được làm sạch được thực hiện bằng cách pha loãng các kháng thể này tới nồng độ 5-10 nM trong dung dịch đệm chạy (10mM Hepes, 0,15M NaCl, 5mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%, độ pH=7,4), tiếp đó là tiêm theo hướng thẳng đứng với tốc độ 30µL/phút trong 60 giây, để tạo ra các điểm bên trong tham chiếu nằm liền kề với tất cả các dòng tế bào chỉ với kháng thể kháng Fc đã được bất động. Thông thường, thu được nồng độ bất giữ cuối của các kháng thể thử nghiệm khoảng 100-300 RU và trị số R_{max} của dịch phân giải là 30-90 RU. Quá trình gắn kết của các protein hTREM-1 hoặc cTREM-1 được thực hiện bằng cách tiêm dịch phân giải (kháng nguyên) lên tất cả các dòng tế bào theo hướng nằm ngang để phân tích so sánh khả năng gắn kết với kháng thể kháng TREM-1 đã được bắt giữ khác nhau so với khả năng gắn kết với điểm bên trong tham chiếu. Các protein hTREM-1 hoặc cTREM-1 được pha loãng theo dãy 1:3 đến 1,2-100 nM hoặc vào dung dịch đệm chạy, được tiêm với tốc độ 100µL/phút trong 250 giây và để phân ly trong 600 giây. Bề mặt GLM được tái tạo sau mỗi chu kỳ tiêm dịch phân giải bằng cách tiêm hai lần, mỗi lần 18 giây 10mM Glyxin, độ pH=1,7 và 50mM NaOH

ở 100 μ L/phút. Bước tái tạo này loại bỏ được kháng thể kháng TREM-1 và protein TREM-1 đã được gắn kết bất kỳ từ bề mặt kháng thể bắt giữ đã được bất động và để tiến hành quá trình gắn kết tiếp theo của cặp mẫu tương tác tiếp theo. Quá trình tái sinh không loại bỏ được kháng thể kháng Fc bắt giữ đã được bất động trực tiếp từ bề mặt chip.

Ái lực gắn kết giữa kháng thể và kháng nguyên được định lượng bằng cách xác định hằng số phân ly cân bằng (K_D) đã được xác định bằng cách đo động học của quá trình tạo ra và phân ly phức hợp. Hằng số tốc độ tương ứng với quá trình liên kết và phân ly phức hợp hoá trị một như k_a (tốc độ liên kết) và k_d (tốc độ phân ly) được đưa ra bằng cách tích hợp dữ liệu vào mô hình Langmuir theo tỷ lệ 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá ProteOn để phân tích dữ liệu. K_D có liên quan đến k_a và k_d thông qua đẳng thức $K_D = k_d / k_a$.

Đường cong gắn kết được xử lý bằng cách tham chiếu kép (trừ tín hiệu bề mặt tham chiếu cũng như dung dịch đệm trắng để tiêm cho kháng thể kháng TREM-1 đã được bắt giữ) trước khi phân tích dữ liệu. Đường cong này có thể cho phép hiệu chỉnh sự nhiễu của thiết bị, dịch chuyển khối và độ lệch trong khi tiêm mẫu.

Nhận thấy tất cả các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 có ái lực hướng đích TREM-1-Fc của người tương tự như kháng thể đơn dòng 0170. Đáng quan tâm là, các biến thể kháng thể đơn dòng chứa thể đột biến “tương tác Fab-TREM-1”, như kháng thể đơn dòng 0322, có ái lực tăng cường hướng đích TREM-1-Fc của khi đuôi dài (Bảng 2).

Ví dụ 3: Động học và độ nhót của kháng thể đơn dòng 0330 và kháng thể đơn dòng 0333

Để nỗ lực tạo ra mAb có cả ái lực cải thiện hướng đích TREM-1 của khi đuôi dài và độ nhót thấp, các thể đột biến từ SEQ ID NO.9 được kết hợp với các thể đột biến trong SEQ ID NO.5, có độ nhót thấp nhất trong số các biến thể kháng thể đơn dòng 0170 và có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, mà nhận thấy có ảnh hưởng nhẹ đối với độ nhót. Ái lực gia tăng hướng đích TREM-1-Fc của khi đuôi dài được duy trì đối với biến thể kháng thể đơn dòng chứa các thể đột biến kết hợp (kháng thể đơn dòng 0330 và kháng thể đơn dòng 0333) và các thể đột biến này không làm ảnh hưởng đến ái lực hướng đích TREM-1-Fc của người. Độ nhót của kháng thể đơn dòng 0330 và kháng thể

đơn dòng 0333 được giảm đáng kể so với kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553 (Fig.1).

Ví dụ 4: Nuôi cấy dòng tế bào BWZ'36/hTREM-1 ổn định

Tế bào chỉ thị BWZ/hTREM-1 được nuôi cấy trong RPMI 1640 w/o phenol đỏ (mã sản phẩm 11835, Gibco, Carlsbad CA, USA), có bổ sung 10% FCS (mã sản phẩm 16140-071, Gibco, New York, USA), 1% Pen/Strep (mã sản phẩm 15070-06, Gibco), Natri Pyruvat 1mM (mã sản phẩm 11360, Gibco), 5 μ M -2ME (mã sản phẩm 31350-010, Gibco) và L-Glutamin 2mM (mã sản phẩm 25030, Gibco). Không cần các đĩa đặc hiệu hoặc việc phủ. 10mL Versene (mã sản phẩm 15040, Gibco) được bổ sung vào để tách các tế bào này mà sau đó được chuyển vào ống, được ly tâm 1200 vòng/phút trong 5 phút và rửa trong RPMI mới 1640 w/o phenol đỏ. Sau đó, các tế bào này được sử dụng ngay trong thử nghiệm hoặc nuôi cấy lại để cấy truyền tiếp.

Ví dụ 5: Mô tả chức năng của các biến thể kháng thể đơn dòng 0170

Khả năng ức chế quá trình truyền tín hiệu TREM-1 của người của các biến thể kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 0170 được xác định bằng cách sử dụng dòng tế bào chỉ thị (BWZ'36/hTREM-1) được cung cấp bởi Bioxell. Dòng tế bào chỉ thị này được kích thích bởi PGN và phối tử TREM-1 PGLYRP1 là protein tái tổ hợp hoặc biểu hiện bởi các bạch cầu trung tính đã được hoạt hóa trước khi ủ bằng kháng thể đơn dòng. Nhận thấy khả năng ức chế quá trình truyền tín hiệu TREM-1 của các biến thể là thích hợp trên lâm sàng và ở mức trung bình so với kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553 (Fig. 2A và B).

Tương tự, khả năng ức chế quá trình truyền tín hiệu TREM-1 của khi đuôi dài được xác định đối với ba biến thể kháng thể đơn dòng 0170 với độ nhớt thấp nhất và quan sát thấy hai biến thể có ái lực gia tăng hướng đích TREM-1 của khi đuôi dài. Trong thử nghiệm này sử dụng dòng tế bào chỉ thị TE 426.27 đã được thiết lập, quan sát thấy khả năng ức chế của các biến thể kháng thể đơn dòng và kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553 là tương tự nhau (Fig.3).

Ngoài ra, khả năng phong bế quá trình giải phóng TNFa ra khỏi các tế bào gốc từ vật cho khỏe mạnh của các biến thể kháng thể đơn dòng được đánh giá. Trong thử nghiệm này, các bạch cầu đơn nhân được biệt hóa thành đại thực bào M2 trong điều kiện

giảm oxy huyết để làm tăng mức biểu hiện TREM-1 và được hoạt hóa với PGN và PGLYRP1 tái tổ hợp trước khi ủ bằng kháng thể đơn dòng. Nhận thấy các biến thể kháng thể đơn dòng có hiệu lực tương tự như 0170 trong việc ức chế quá trình giải phóng TNF α do TREM-1 gây ra ra khỏi đại thực bào M2 bị giảm oxy huyết (Fig. 4).

Ví dụ 6: Cấu trúc tinh thể của phức hợp Fab 0170-Fab 0170

Khả năng tương tác của kháng thể đơn dòng 0170 phân tử bởi tính tự tương tác đặc hiệu được đánh giá bằng cách phân tích tinh thể của cấu trúc tinh thể Fab 0170-Fab 0170.

Vật liệu: Vùng Fab kháng thể đơn dòng 0170 (SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.19) trong dung dịch đệm chứa 10mM phosphat, 2,68mM KCl, 140mM NaCl, độ pH=7,4 ở nồng độ protein bằng 8,5mg/mL.

Phương pháp: Vùng Fab kháng thể đơn dòng 0170 được kết tinh trong thử nghiệm dung hợp dạng hơi giọt treo bằng cách tạo cân bằng giữa giọt chứa 2 μ L dung dịch protein được trộn với 2 μ L dung dịch dự trữ với 0,5mL dung dịch dự trữ bao gồm 20% (khối lượng/thể tích) PEG 8000, 200mM K₂HPO₄. Tinh thể được chuyển vào giọt chứa 2 μ L 35% (khối lượng/thể tích) PEG3350, 200mM K₂HPO₄ và được đưa lên vòng litholoop đường kính 0,2 mm (Molecular Dimensions Limited) và làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng.

Dữ liệu về nhiễu xạ tia X được thu thập ở Trường đại học MAXLAB 911-2, Lund, Thụy Điển bằng cách sử dụng dòng đông khô nhanh Cryo được vận hành ở 100 K. Hình ảnh về dữ liệu thô được biểu thị, tích hợp và được chia tỷ lệ bằng cách sử dụng gói chương trình XDS (Kabsch, Acta Crystallogr. D66, 133-144 (2010)). Nhóm không gian của tinh thể là P2(1)2(1)2(1), với các thông số về ô đơn vị, a = 62,4 Å, b = 110,9 Å, c = 158,4 Å. Dữ liệu thu thập để phân giải 2,40 Å. Cấu trúc này được giải thích bằng cách thay thế phân tử bằng cách sử dụng phần mềm Phenix (Adams et al., Acta Crystallogr. D66, 213—221 (2010)) như được thực hiện trong bộ chương trình CCP4i (Potterton et al., Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003)). Các mô hình nghiên cứu là các cấu trúc của chuỗi nặng từ đầu vào pdb 1AD0.pdb (mức độ tương đồng 85%) và chuỗi nhẹ từ đầu vào pdb 2QRG (94% identity). Việc làm sạch cấu trúc được thực hiện bằng cách sử dụng Refmac5 (Murshudov et al., Acta Crystallogr. D53, 240-255 (1997)) từ bộ chương trình

CCP4i. Phiên bản Coot 7 (Emsley et al., Acta Crystallogr. D66, 486-501 (2010)) được sử dụng để tái tạo và phê chuẩn cấu trúc bằng tay.

Kết quả và thảo luận

Cấu trúc tinh thể của vùng Fab của kháng thể đơn dòng 170 chứa bốn phân tử Fab trong đơn vị không đối xứng (chuỗi nặng được đánh dấu là A và C, chuỗi nhẹ được đánh dấu là B và D). Phân tử Fab được đóng gói ở dạng dimer với các vùng gắn kết với kháng nguyên của một phân tử Fab tương tác với kháng nguyên gắn kết vùng của phân tử Fab khác. Nó không thể chứa và làm sạch cysteine cuối cùng từ SEQ ID NO.19 trong cấu trúc tinh thể mặc dù mong muốn rằng nó nằm trong liên kết disulphua với Xys từ SEQ ID NO.18 từ chuỗi nặng. Nhận thấy rằng lượng dư mật độ điện tử 2Fo-Fc và Fo-Fc nằm trong khu vực này, và liên kết disulphua có thể có mặt trong bộ phụ của phân tử Fab. Không thấy tín hiệu sigmaa đáng kể làm ảnh hưởng tới mật độ điện tử 2Fo-Fc đối với các gốc G26, K78-N79, I104-R105 và S138-E141 từ SEQ ID NO.18 trong chuỗi A trong đơn vị không đối xứng và đối với E1, G26-F 27, M102-R105, S136-E141, S195-K200 từ SEQ ID NO.18 trong chuỗi C trong phân tử Fab khác trong đơn vị không đối xứng. Sigmaa đáng kể ảnh hưởng đến mật độ điện tử 2Fo-Fc cũng bị khuyết đối với các gốc D30-Y34 từ SEQ ID NO.19 trong chuỗi D. Các gốc này không nằm trong cấu trúc tinh thể nhưng lại liên quan tới phân tích tương tác của phân tử của bề mặt chung Fab-Fab bằng cách xếp chồng với cấu trúc tinh thể của kháng thể đơn dòng 0170 của WO2013/120553 bộc lộ cấu trúc tinh thể của kháng thể đơn dòng 01070 kháng TREM-1 nhân tạo.

Các thông số chất lượng về cấu trúc của mảnh Fab kháng thể đơn dòng 0170 chỉ ra rằng yếu tố R toàn phần của cấu trúc này = 24% và yếu tố R tự do = 30%. Hệ số tương quan toàn phần là 0,93 và chỉ số chính xác về thành phần nhiễu xạ, DPI = 0,3 Å (Cruickshank, Acta Crystallogr. D55, 583-601 (1999)). Độ lệch căn bậc hai của chiều dài liên kết trong cấu trúc này thu được từ chiều dài liên kết lý tưởng = 0,025 Å và độ lệch căn bậc hai từ góc liên kết lý tưởng = 2,326° (Engh and Huber, Acta Crystallogr. A47, 392-400 (1991)).

Phân tích khoảng cách nội phân tử được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình NCONT trong bộ chương trình CCP4 (Potterton et al., Acta Crystallogr. D59, 1131-1137

(2003)) với điểm cắt là 4Å đối với khoảng cách nội phân tử (Bảng 4). Phân tích này chứng minh rằng các gốc axit amin N57 và A59 từ SEQ ID NO.2 thuộc nhóm axit amin có liên quan tới quá trình tương tác Fab-Fab trong cấu trúc tinh thể.

Bảng 4. Quá trình tương tác Fab-Fab dự đoán dựa trên sự chồng lấp của cấu trúc tinh thể của kháng thể đơn dòng 01070 kháng TREM-1 nhân tạo đã được bộc lộ trong WO2013/120553 với cấu trúc tinh thể của vùng Fab của kháng thể đơn dòng 0170 quan sát được theo sáng chế.

Axit amin nguồn, Fab 1 (Chuỗi A và B)		Axit amin đích, Fab 2 (Chuỗi C và D)	
F32	SEQ ID NO.3	Y32	SEQ ID NO.2
F32	SEQ ID NO.3	M102	SEQ ID NO.2
D33	SEQ ID NO.3	Y53	SEQ ID NO.3
Y34	SEQ ID NO.3	Y34	SEQ ID NO.3
Y34	SEQ ID NO.3	R54	SEQ ID NO.3
D98	SEQ ID NO.3	S55	SEQ ID NO.2
R52	SEQ ID NO.2	S55	SEQ ID NO.2
R52	SEQ ID NO.2	S56	SEQ ID NO.2
S55	SEQ ID NO.2	A59	SEQ ID NO.2
S55	SEQ ID NO.2	R52	SEQ ID NO.2
S56	SEQ ID NO.2	S56	SEQ ID NO.2
N57	SEQ ID NO.2	S56	SEQ ID NO.2
N57	SEQ ID NO.2	N57	SEQ ID NO.2
N57	SEQ ID NO.2	A59	SEQ ID NO.2
A59	SEQ ID NO.2	S55	SEQ ID NO.2
A59	SEQ ID NO.2	S56	SEQ ID NO.2
A59	SEQ ID NO.2	N57	SEQ ID NO.2
I104	SEQ ID NO.2	I104	SEQ ID NO.2
I104	SEQ ID NO.2	R106	SEQ ID NO.2
R106	SEQ ID NO.2	F32	SEQ ID NO.3

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa VL và VH, trong đó VL là VL trong chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, và SEQ ID NO.14 và VH là VH trong chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, và SEQ ID NO.16.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định.
3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó vùng hằng định này là IgG1, IgG2, hoặc IgG4.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
5. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định of IgG4.
6. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ này chứa chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và chuỗi nặng này chứa chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
7. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
8. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
9. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
10. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

11. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
12. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
13. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.
14. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15.
15. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16.
16. Kháng thể hoặc mảnh của nó chứa VL và VH, trong đó VL là VL trong chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và VH là VH trong chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, và SEQ ID NO.16.
17. Kháng thể theo điểm 16, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định.
18. Kháng thể theo điểm 17, trong đó vùng hằng định này là IgG1, IgG2, hoặc IgG4.
19. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 16, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11.
20. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 16, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.12.

21. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 16, trong đó VL là VL của chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và VH là VH của chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.13.

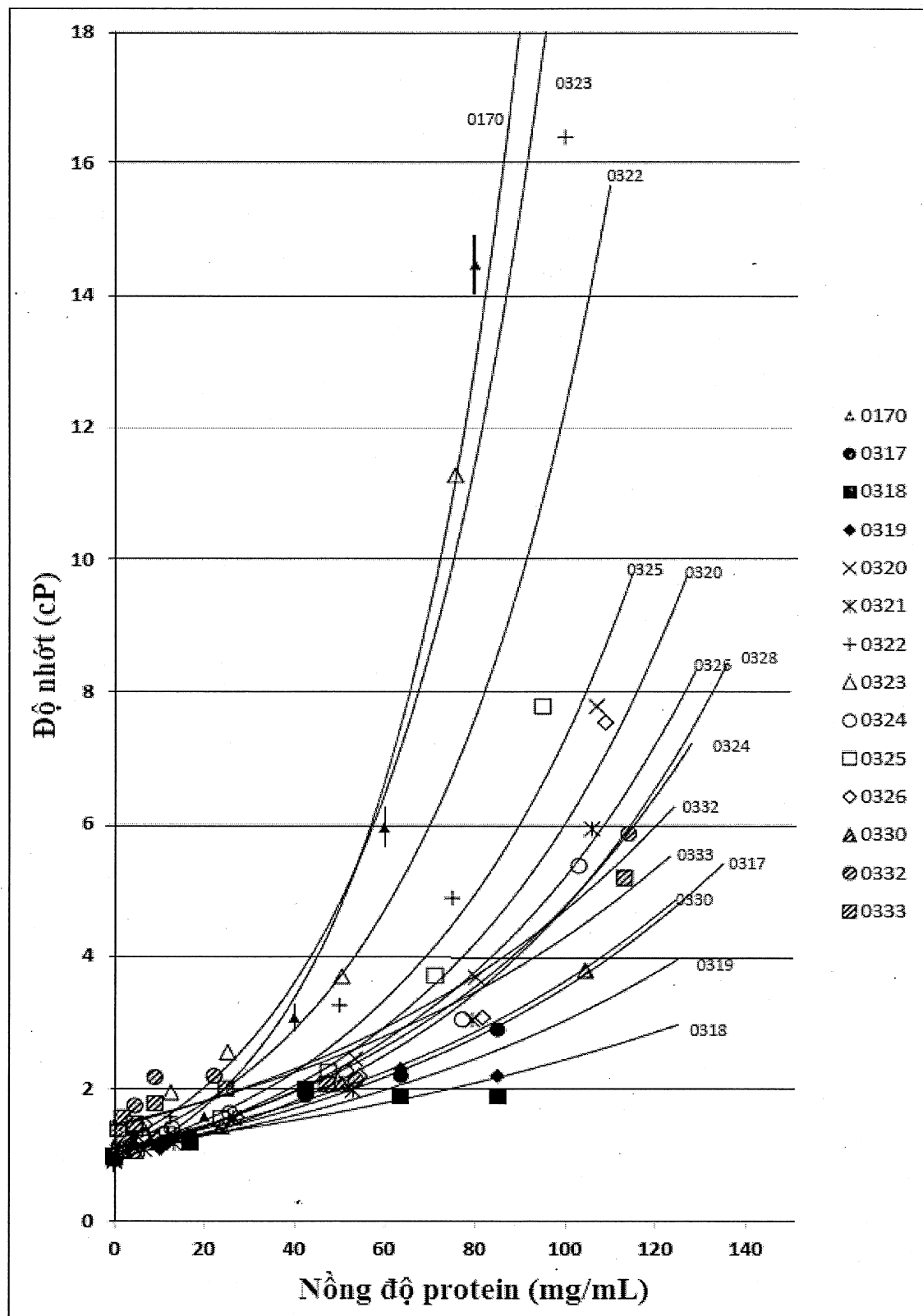
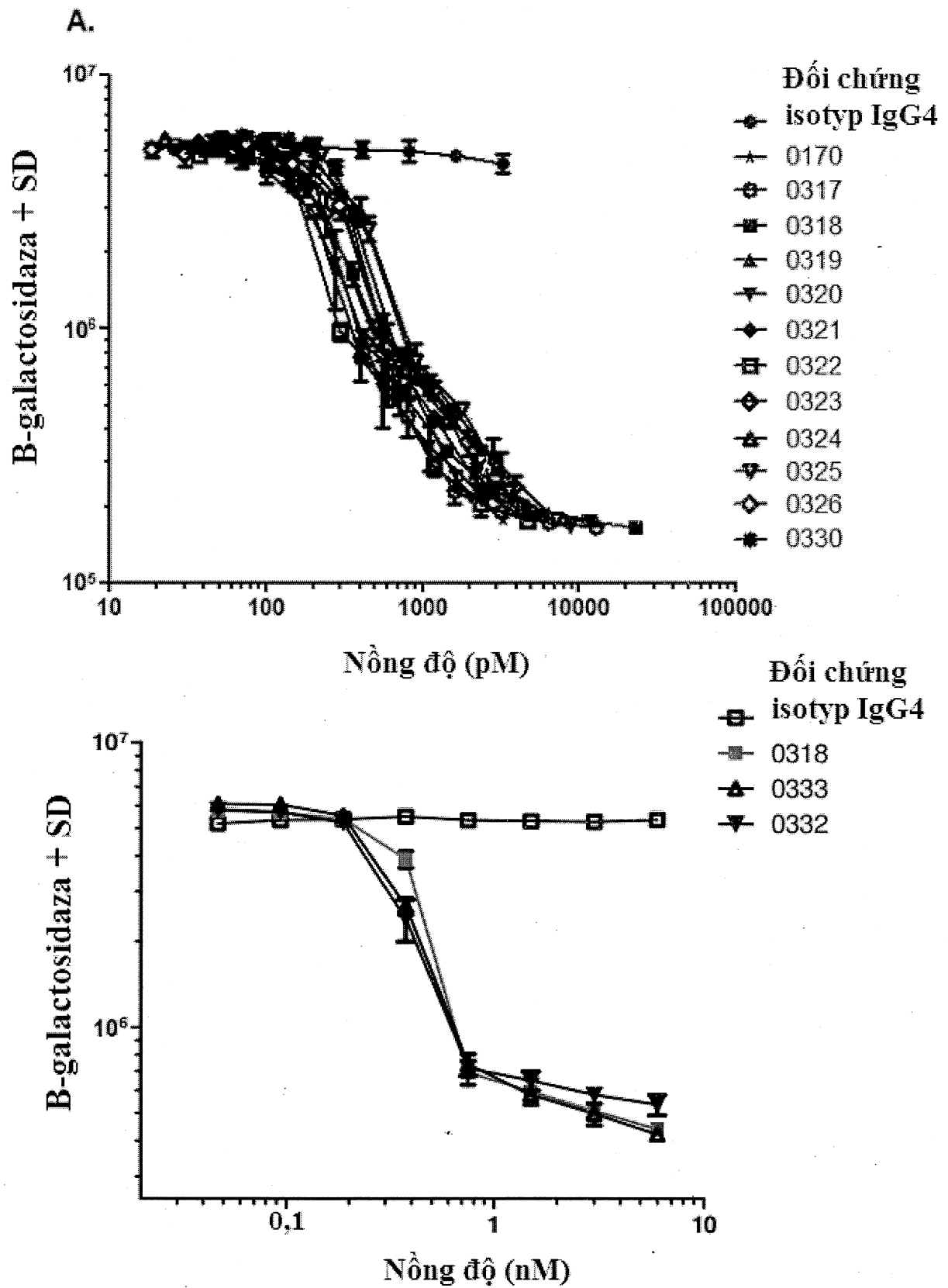
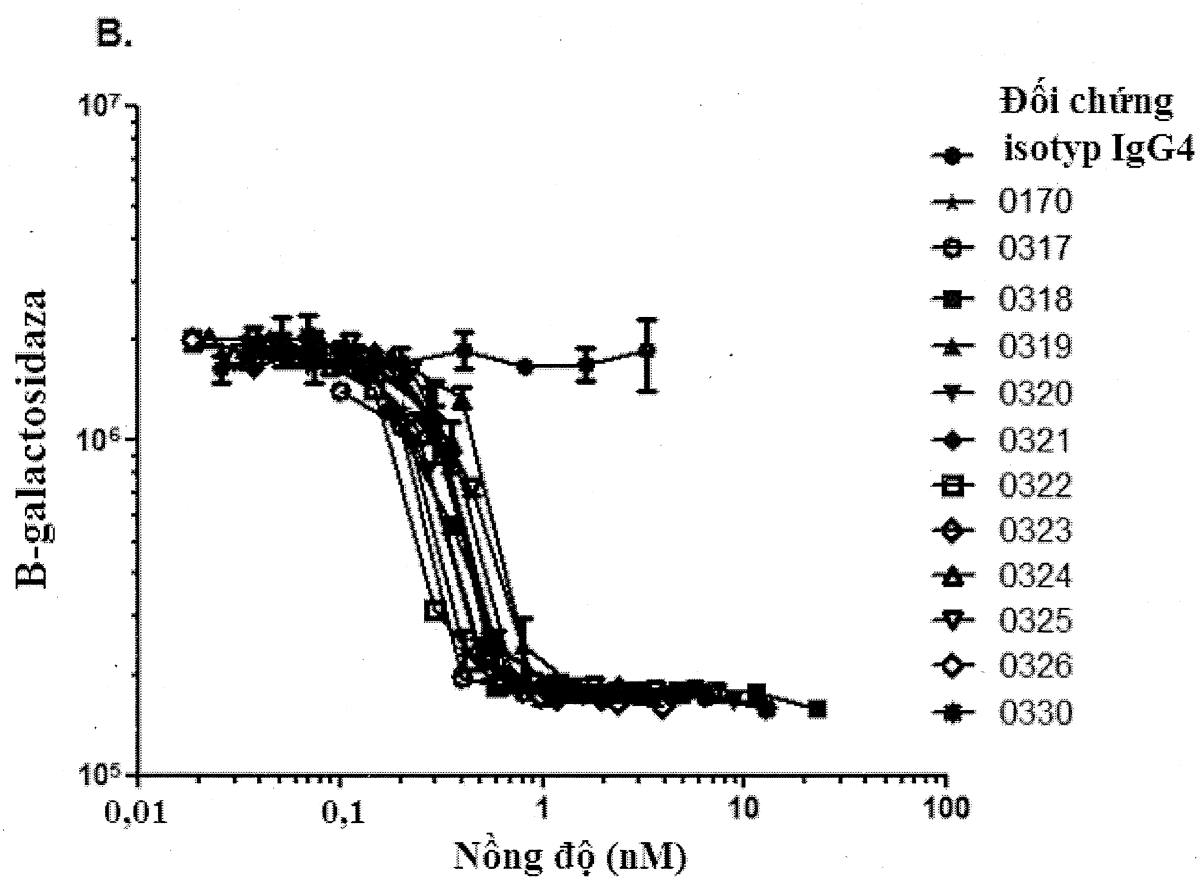


Fig.1

**Fig.2**

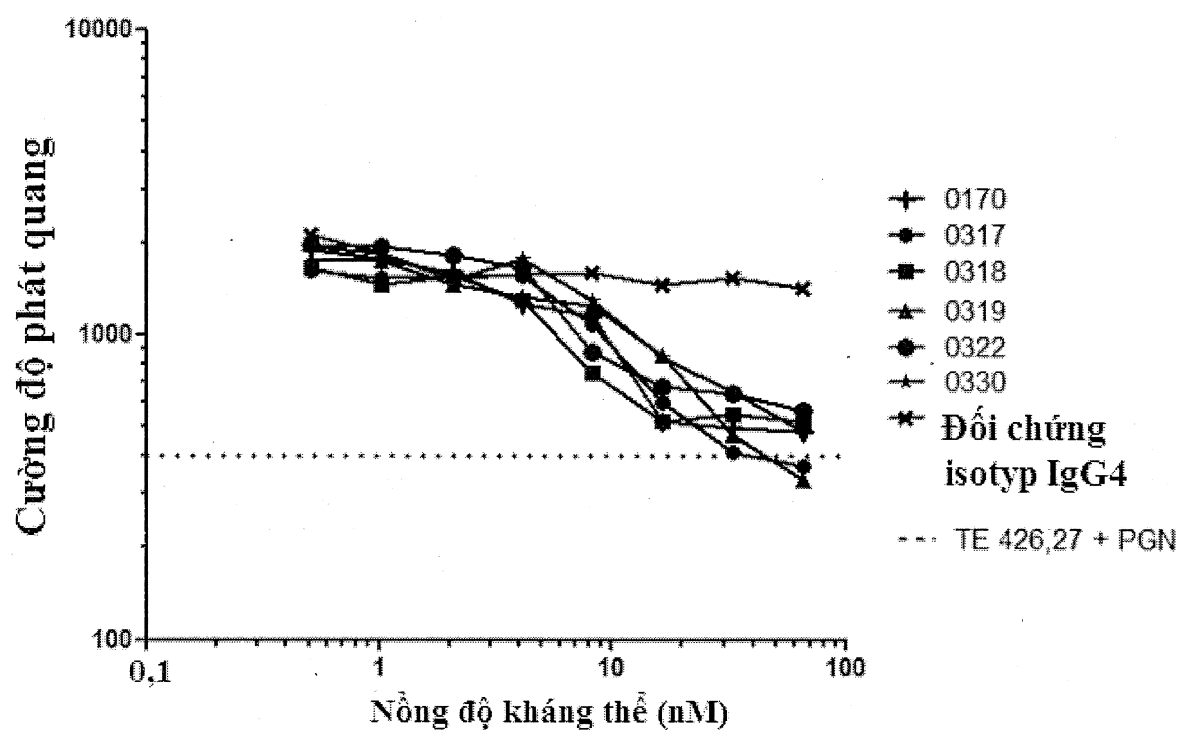
Kháng thể đơn dòng	IC₅₀ (nM)
0170	0,24
0317	0,21
0318	0,47
0319	0,23
0320	0,39
0321	0,20
0322	0,26
0323	0,35
0324	0,41
0325	0,31
0326	0,36
0330	0,24
0332	0,32
0333	0,33

Fig.2A



SEQ ID NO.	IC50 (nM)
0170	0,24
0317	0,33
0318	0,49
0319	0,27
0320	0,32
0321	0,19
0322	0,26
0323	0,34
0324	0,37
0325	0,31
0326	0,31
0330	0,22

Fig.2B



SEQ ID NO.	IC50 (nM)
0170	6,0
0317	9,5
0318	5,6
0319	17,7
0322	5,9
0330	10,7

Fig.3

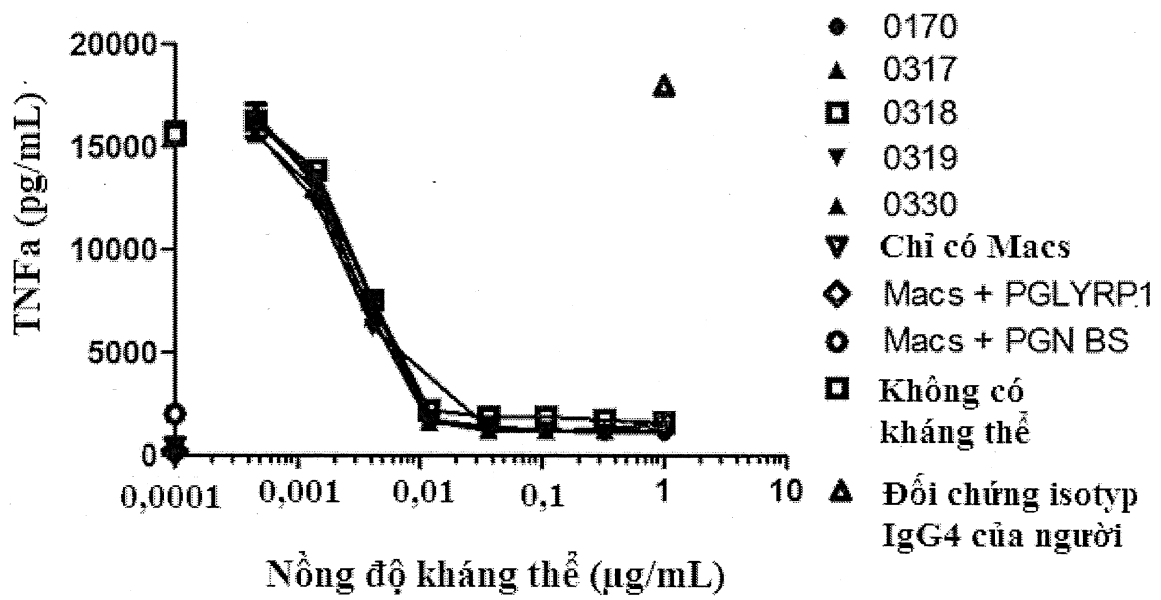
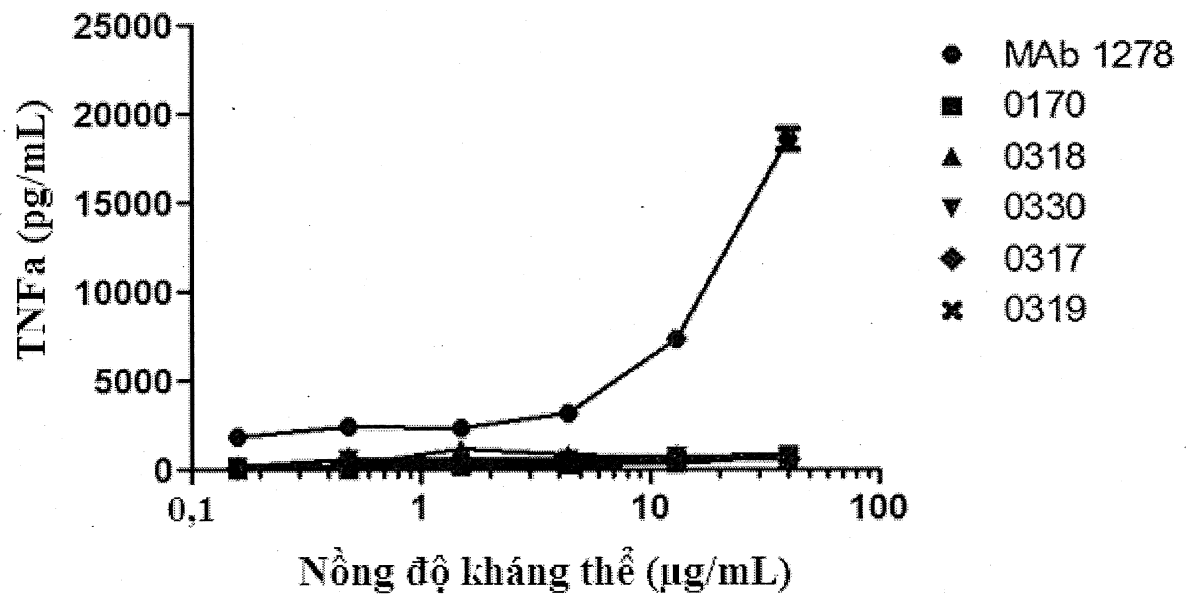
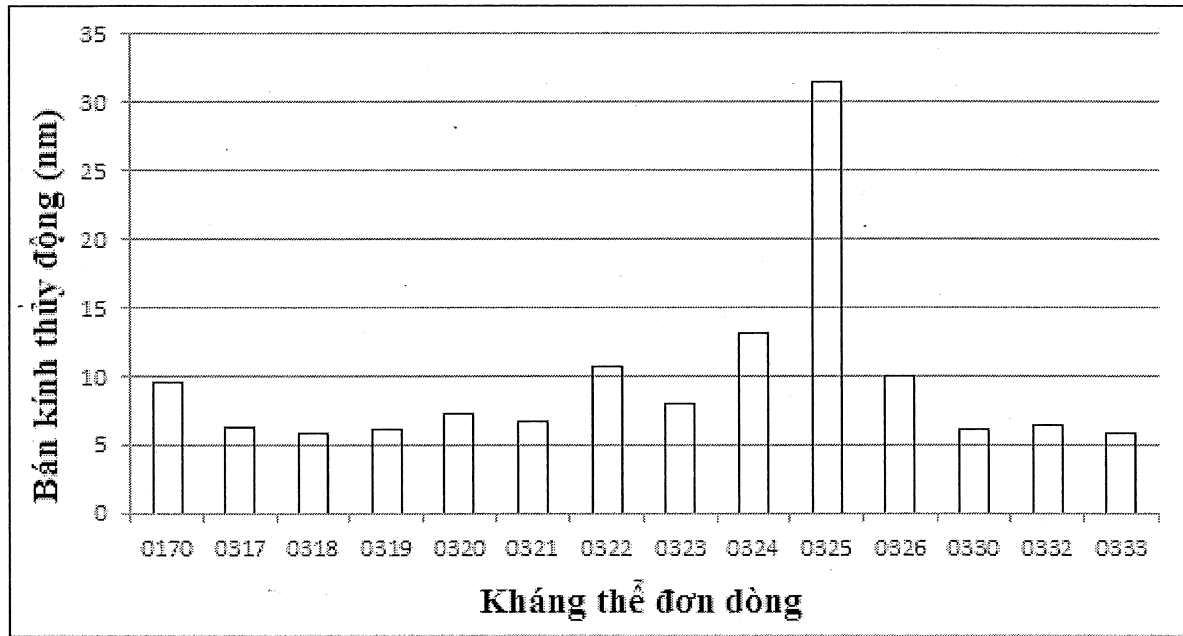


Fig.4

**Fig.5**

**Fig.6**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NOVO NORDISK A/S
 <120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT VÀ PHONG BÊ TREM-1
 <130> P45251WO-PJG
 <150> EP14177547.8
 <151> 2014-07-17
 <150> EP14194893.5
 <151> 2014-11-26
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1
 Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
 20 25 30
 Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
 35 40 45
 Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
 50 55 60
 Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
 65 70 75 80
 Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
 85 90 95
 Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
 100 105 110
 Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
 115 120 125
 Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
 130 135 140
 Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
 165 170 175
 Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
 180 185 190
 Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile
 195 200 205
 Leu Leu Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu
 210 215 220
 Phe Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Val Pro
 225 230
 <210> 2
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

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

<210> 3

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Chuỗi

<222> (1)..(218)

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1

<400> 3

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

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1

<400> 6

```

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

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1

<400> 7

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

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1
 <400> 9

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

<210> 10
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1
 <400> 10

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

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 11
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 12
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

```

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
      50      55      60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
      65      70      75      80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85      90      95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
      100      105      110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115      120      125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
      130      135      140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
      145      150      155      160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165      170      175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
      180      185      190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
      195      200      205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
      210      215      220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
      225      230      235      240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245      250      255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
      260      265      270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275      280      285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      290      295      300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      305      310      315      320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
      325      330      335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      340      345      350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355      360      365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370      375      380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      385      390      395      400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
      405      410      415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420      425      430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435      440      445
<210> 13
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
      20      25      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Ser Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala
      50      55      60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
      65      70      75      80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85      90      95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
      100      105      110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115      120      125

```

```

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130      135      140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145      150      155      160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165      170      175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180      185      190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195      200      205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210      215      220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225      230      235      240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245      250      255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260      265      270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275      280      285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290      295      300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305      310      315      320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325      330      335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340      345      350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355      360      365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370      375      380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385      390      395      400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405      410      415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420      425      430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435      440      445
<210> 14
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo TREM-1
<400> 14
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Ala
20      25      30
Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65      70      75      80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85      90      95
Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100      105      110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115      120      125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130      135      140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145      150      155      160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165      170      175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180      185      190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195      200      205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210      215
<210> 15
<211> 448

```

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20      25      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50      55      60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65      70      75      80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85      90      95
Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100     105     110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115     120     125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130     135     140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145     150     155     160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165     170     175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180     185     190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195     200     205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210     215     220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225     230     235     240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245     250     255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260     265     270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275     280     285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290     295     300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305     310     315     320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325     330     335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340     345     350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355     360     365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370     375     380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385     390     395     400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405     410     415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420     425     430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435     440     445

<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo TREM-1
<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20      25      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50      55      60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65      70      75      80

```

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 17

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

Val Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Phe
 210 215 220
 Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Gly Pro
 225 230
 <210> 18
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc biểu hiện để kết tinh
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215
 <210> 19
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc biểu hiện để kết tinh
 <400> 19
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215