



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 974 575**

⑮ Int. Cl.:
C07K 16/28
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑬ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/EP2015/066501**

⑭ Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009086**

⑮ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15738925 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3172232**

⑭ Título: **Mutagénesis dirigida al sitio de anticuerpos contra TREM-1 para disminuir la viscosidad**

⑩ Prioridad:

**17.07.2014 EP 14177547
26.11.2014 EP 14194893**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2024

⑪ Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK**

⑫ Inventor/es:

**HENRIKSEN, ANETTE;
KJAERGAARD, KRISTIAN;
WESTPHAL STENNICKE, VIBEKE y
WIBERG, CHARLOTTE**

⑬ Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 974 575 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutagénesis dirigida al sitio de anticuerpos contra TREM-1 para disminuir la viscosidad

5 **CAMPO TÉCNICO**

[0001] La presente invención está dirigida a mAb contra TREM-1 y a la mutación de aminoácidos específicos cargados negativamente y sin carga involucrados en las autointeracciones de mAb contra TREM-1 o en las interacciones de mAb contra TREM-1 con TREM-1 para reducir la viscosidad de una solución de mAb y retener la afinidad objetivo, y la presente invención se refiere a dichos anticuerpos para uso terapéutico, tal como se indica en las reivindicaciones.

10 **LISTADO DE SECUENCIAS**

[0002]

15 SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 humano de tipo salvaje (wt)

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0170 deWO2013/120553).

20 SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0170 deWO2013/120553).

SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0317, E27Q, E97S).

25 SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0318, E27Q, E97Q).

30 SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0319, E97S).

SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0320, E97Q).

35 SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0321, E27Q).

SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0322, F32A).

40 SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0323, F32S).

45 SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0324, A59Y).

SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0325, N57S).

50 SEQ ID NO: 13 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0326, A59Y, N57S).

SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0330, F32A, E27Q, E97Q).

55 SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0332, A59Y; 0332 es un mAb combinado de SEQ ID NO: 15 como HC y SEQ ID NO 5 como LC, Tabla 1).

60 SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo contra TREM-1 humanizado (mAb 0333, A59Y; 0333 es un mAb combinado de SEQ ID NO: 16 como HC y SEQ ID NO 14 como LC, Tabla 1).

SEQ ID NO: 17 representa la secuencia de aminoácidos de cTREM-1 de longitud completa.

65 SEQ ID NO 18 representa la cadena pesada de la región Fab del mAb 0170.

SEQ ID NO 19 representa la cadena ligera de la región Fab del mAb 0170.

ANTECEDENTES

- 5 [0003] TREM-1 es un receptor activador expresado en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Estas células desempeñan un papel principal en enfermedades inflamatorias crónicas al liberar citoquinas y otros mediadores que impulsan la inflamación. La expresión del ARNm y de la proteína TREM-1 está regulada positivamente en pacientes con AR y EII, y las células TREM-1 positivas se acumulan en los sitios de inflamación, lo que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. La proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 (PGLYRP1) expresada principalmente por neutrófilos activados es un ligando para TREM-1 y media la señalización de TREM-1 tras la unión.
- 10 [0004] In vitro, la activación de TREM-1 desencadena la secreción de citocinas proinflamatorias que incluyen TNF, IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos-1. Además, la señalización de TREM-1 crea sinergia con múltiples receptores tipo Toll (TLR, Toll-like receptor) para reforzar aún más las señales proinflamatorias. A su vez, esto regula positivamente la expresión de TREM-1, lo que genera un círculo vicioso que amplifica la inflamación. Cada vez hay más evidencia que indica que los TLR contribuyen al desarrollo y progresión de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la AR y la EII.
- 15 [0005] El documento WO 2013/120553 describe mAb anti-TREM-1 humanizados que inhiben la función de TREM-1 tanto humana como de cynomolgus. Sin embargo, el perfil de viscosidad de los mAb anti-TREM-1 puede obstaculizar el proceso de fabricación para producir un producto farmacéutico a >50 mg/ml y podría limitar el ajuste de dosis óptima en la clínica. A menudo se necesitan dosis altas (varios mg/kg) de agentes terapéuticos proteicos para lograr un efecto clínico adecuado y dado que la gran mayoría de estos agentes terapéuticos se administran por vía subcutánea, la consecuencia es que la autoadministración del agente terapéutico por parte del paciente se limita a volúmenes de < 1,5 ml (Shire y et al., J. Pharm. Ciencia. 2004, 93, 1390-1402). El desarrollo de formulaciones de proteínas de alta concentración adecuadas para la autoadministración del paciente es un obstáculo general para la fabricación y suministro cuando la formulación de proteínas da como resultado una alta viscosidad de la solución resultante.
- 20 [0006] La distribución de carga de los mAb se ha estudiado con respecto al efecto sobre el comportamiento de la viscosidad de las soluciones de mAb (Yadav et al., Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802). Además, se ha observado que las interacciones débiles de carga no específicas que persisten en soluciones diluidas influyen en la viscosidad de las soluciones concentradas de mAb (Connolly et al., Biophys. J., 2012, 103, 69-78.). Los remedios para reducir la viscosidad de las soluciones de mAb han sido introducir mutaciones de intercambio de carga dirigidas al sitio que alteran las interacciones intermoleculares de carga-carga directa. Yadav et al., Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 791-802) o la adición de sales o contraiones (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). Sin embargo, la adición de sales y contraiones puede tener efectos adversos para el paciente en términos de hiperosmolalidad de la solución administrada.
- 25 [0007] El documento WO 2013/120553 describe anticuerpos que se unen y bloquean el receptor desencadenante expresado en las células mieloídes-1 (TREM-1).
- 30 [0008] El documento WO 2014/072876 describe anticuerpos específicos del factor de crecimiento b derivado de plaquetas y sus composiciones y usos.
- 35 [0009] Ketchem Randal et al., American Chemical Society. Resúmenes de trabajos (en el encuentro nacional). American Chemical Society, EE. UU., Vol. 243 (25 de marzo de 2012) describe la mitigación de la viscosidad de anticuerpos monoclonales mediante la modificación de la carga superficial de la proteína.
- 40 [0010] Anuj Chaudhri et al. The Journal of Physical Chemistry B, volumen 117, n.º 5 (7 de febrero de 2013), páginas 1269-1279, describe el papel de la secuencia de aminoácidos en la autoasociación de anticuerpos monoclonales terapéuticos: conocimientos a partir de modelos generales.
- 45 [0011] Sandeep Yadav et al., Pharmaceutical research, Vol 28, no. 7 (6 de abril de 2011), páginas 1750-1764, describe el establecimiento de un vínculo entre secuencias de aminoácidos y el comportamiento viscoelástico y de autoasociación de dos anticuerpos monoclonales estrechamente relacionados.
- 50 [0012] D. Bethea et al., Proteína engineering design and selection, vol. 25, n.º10 (22-08-2012), páginas 531-538, describe mecanismos de autoasociación de un anticuerpo monoclonal humano CNT0607.
- 55 [0013] Tim J Kamerzell et al., Advanced drug delivery reviews, Vol 63. No. 13, (26 de julio de 2011), páginas 1118-1159, describe las interacciones entre excipientes y proteínas: mecanismos y caracterización biofísica aplicados al desarrollo de formulaciones de proteínas.
- 60 [0014] Jan Jezek et al., Advanced drug delivery reviews, Vol 63. No 13 (2 de septiembre de 2011), páginas 1107-1117,
- 65

describe la viscosidad de composiciones proteicas terapéuticas concentradas.

[0015] Anja Drescher, cita en Internet publicada el 27 de junio de 2011, describe la caracterización de interacciones biológicas con Biacore.

[0016] En el presente documento se divultan anticuerpos contra TREM-1 generados por mutación específica de sitio de las CDR del mAb 0170 anti-TREM-1 humanizado divulgado en el documento WO 2013/120553. Los anticuerpos divulgados no alteran las autointeracciones directas de carga-carga intermolecular del mAb, pero tienen un perfil de viscosidad favorable y un perfil de unión a la diana mantenido. El perfil de viscosidad favorable permite que el producto farmacéutico se produzca en altas concentraciones que podrían ser esenciales para el uso terapéutico y farmacéutico. Dichos anticuerpos pueden tener un impacto sustancial sobre la calidad de vida de personas con sepsis o una enfermedad inflamatoria crónica, tal como la artritis reumatoide, la artritis psoriásica y la enfermedad inflamatoria intestinal.

15 CARACTERÍSTICAS

[0017] La presente invención se define en las reivindicaciones independientes y ciertas características opcionales de las mismas se definen en las reivindicaciones dependientes. La información técnica expuesta a continuación puede en algunos aspectos ir más allá del alcance de la presente invención, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. En la medida en que los términos "invención", "ejemplo" y "realización" se utilicen en el presente documento, estos términos se interpretarán de tal manera que la protección no se extienda más allá del alcance de las reivindicaciones. Cualquier referencia a procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y prácticas de procedimientos de diagnóstico en el cuerpo humano o animal no deben interpretarse como una reivindicación de protección para dichos procedimientos como tales, sino que deben interpretarse como una referencia a productos, en particular sustancias o composiciones para uso en cualquiera de estos procedimientos.

[0018] En un aspecto, la presente invención da a conocer un anticuerpo que es capaz de unirse y bloquear TREM-1, que comprende:

- (i) una cadena pesada, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 4;
 - (ii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5;
 - (iii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6;
 - (iv) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 7;
 - (v) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 8;
 - (vi) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9;
 - (vii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10;
 - (viii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14;
 - (ix) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (x) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (xi) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (xii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5; o
 - (xiii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14;
- en las que la cadena pesada comprende una región constante de IgG4.

[0019] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5.

[0020] En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0021] Aspectos adicionales de la presente invención se refieren a una célula procariota o eucariota que expresa de forma recombinante el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones); y un procedimiento para producir el anticuerpo de la presente invención, que comprende expresar de forma recombinante el anticuerpo en una célula procariota o eucariota.

5 [0022] En un aspecto adicional, la presente invención también da a conocer el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) o la composición farmacéutica de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones), para su uso como medicamento en un sujeto que lo necesita.

10 [0023] En algunas realizaciones, el tratamiento es de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesita, tal como una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, diabetes tipo I, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmune, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjögrens, nefritis autoinmune, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunes que son el resultado de una inflamación aguda o crónica. En algunas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica de la presente invención se administra de forma profiláctica. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

25 [0024] Tal como se demuestra en el presente documento, el mAb anti-TREM-1 de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) tiene un perfil de viscosidad en el rango esperado para los mAb monoméricos y bloquea la función de TREM-1 tan potentemente como el mAb0170 del documento WO 2013/120553. Además de los perfiles de viscosidad ventajosos de las variantes de mAb de la presente invención, dichas variantes no muestran agonismo hacia el receptor TREM-1.

BREVE Descripción de los dibujos.

30 [0025] La Figura 1 representa el perfil de viscosidad de las variantes de mAb anti-TREM-1 y sus ajustes de curva exponencial. La Figura 2 representa la capacidad de las variantes de mAb 0170 para inhibir la señalización de TREM-1 humano en la línea celular informadora de TREM-1 humana (BWZ'36/hTREM-1) estimulada con PGN y (A) PGLYRP1 recombinante o (B) PGLYRP1 expresada por neutrófilos activados (promedio de donantes de N). La Figura 3 representa la capacidad de las variantes de mAb 0170 para inhibir la señalización de TREM-1 de cynomolgus en la línea celular informadora de TREM-1 de cynomolgus (TE426.27) estimulada con PGN y PGLYRP1 recombinante. La Figura 4 representa la capacidad de las variantes de mAb 0170 para inhibir la liberación de TNF α de macrófagos M2 hipóxicos estimulados con PGN y PGLYRP1 recombinante. La Figura 5 representa el potencial agonístico de las variantes de mAb 0170 unidas a la placa para inducir la liberación de TNF de macrófagos M2 hipóxicos. Se utilizó MAb 1278 (R&D) como control positivo. La Figura 6 representa el radio hidrodinámico de las variantes de mAb anti-TREM-1 en comparación con el mAb 0170.

45 DESCRIPCIÓN

50 [0026] TREM-1 es una proteína transmembrana que consiste en 234 aminoácidos, incluido un único dominio de inmunoglobulina extracelular y una cola citoplasmática corta sin motivo de señalización aparente. Cuando se activa, TREM-1 se asocia con la proteína adaptadora de señalización que contiene ITAM, DAP12. La señalización cascada abajo puede incluir la activación del factor de transcripción NFAT, lo que provoca una regulación positiva de la producción de citoquinas proinflamatorias.

55 [0027] La presente invención se refiere a anticuerpos que son capaces de unirse y bloquear específicamente la función de TREM-1, tal como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos de la presente invención pueden bloquear la función de TREM-1 reduciendo/bloqueando la activación de TREM-1 y la señalización cascada abajo.

60 [0028] Los anticuerpos según la presente invención pueden bloquear TREM-1 mediante uno o una combinación de varios mecanismos diferentes, bloqueando TREM-1 directa o indirectamente. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden impedir que el ligando natural de TREM-1, la proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 (PGLYRP1), cree un complejo funcional con TREM-1 y/o los anticuerpos de la presente invención pueden bloquear TREM-1 impidiendo que moléculas individuales de TREM-1 formen dímeros o multímeros. La dimerización o multimerización de TREM-1 puede reducirse o impedirse mediante anticuerpos contra TREM-1 que son capaces de unirse a una parte de TREM-1 que, de otro modo, residiría en la interfaz de un dímero de TREM-1, evitando así que las moléculas individuales de TREM-1 se asocien entre sí.

65 [0029] La dimerización o multimerización de TREM-1 puede reducirse o prevenirse mediante anticuerpos TREM-1 que

interfieren con la interacción de TREM-1 con su ligando. Los anticuerpos según la presente invención pueden bloquear la activación de TREM-1 inducida por PGLYRP1. PGLYRP1, una proteína altamente conservada de 196 aminoácidos de longitud que consiste en un péptido señal y un dominio de unión a peptidoglicano, se expresa en los neutrófilos y se libera tras su activación. Los anticuerpos según la presente invención pueden regular negativamente la liberación de citoquinas proinflamatorias de las células mieloides. Los anticuerpos según la presente invención pueden bloquear la liberación de TNF, MIP-1beta, MCP-1, IL-1beta, GM-CSF, IL-6 y/o IL-8 de macrófagos, neutrófilos, células de tejido sinovial y/o una célula informadora, tal como se describe en el presente documento.

5 [0030] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces de unirse tanto a TREM-1 humano como a TREM-1 de otra especie distinta del ser humano. El término "TREM-1", tal como se utiliza en el presente documento, abarca así cualquier forma natural de TREM-1 que pueda derivarse de cualquier organismo adecuado. Por ejemplo, TREM-1 para su uso tal como se describe en el presente documento puede ser TREM-1 de vertebrados, tal como TREM-1 de mamífero, tal como TREM-1 de un primate (tal como un ser humano, un chimpancé, un mono cynomolgus o un mono rhesus); un roedor (tal como un ratón o una rata), un lagomorfo (tal como un conejo) o un artiodáctilo (tal como una vaca, una oveja, un cerdo o un camello). Preferiblemente, la TREM-1 es SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana). TREM-1 puede ser una forma madura de TREM-1, tal como una proteína TREM-1 que se ha sometido a un procesamiento postraduccional dentro de una célula adecuada. Una proteína TREM-1 madura de este tipo puede estar, por ejemplo, glicosilada. TREM-1 puede ser una proteína TREM-1 de longitud completa.

10 20 [0031] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales, en el sentido de que derivan directa o indirectamente de un único clon de un linfocito B. Los anticuerpos contra TREM-1 se pueden producir, cribar y purificar usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en los Ejemplos del documento WO2013/120553. En resumen, un ratón adecuado, tal como un ratón knock-out (KO) en TREM-1 o TREM-1/TREM-3, puede inmunizarse con TREM-1, una célula que expresa TREM-1 o una combinación de ambos.

15 25 [0032] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser policlonales en el sentido de ser una mezcla de anticuerpos monoclonales según la presente invención.

30 35 [0033] El cribado primario de sobrenadantes de hibridoma se puede realizar usando ELISA directo o FMAT y el cribado secundario se puede realizar usando citometría de flujo. Los sobrenadantes de hibridoma positivos pueden entonces cribarse en un ensayo de gen informador.

40 45 [0034] Los anticuerpos pueden expresarse de forma recombinante en células procariotas o eucariotas. La célula procariota puede ser *E. coli*. La célula eucariota puede ser una célula de levadura, insecto o mamífero, tal como una célula derivada de un organismo que es un primate (tal como un humano, un chimpancé, un mono cynomolgus o un mono rhesus), un roedor (tal como un ratón o una rata), un lagomorfo (tal como un conejo) o un artiodáctilo (tal como una vaca, oveja, cerdo o camello). Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitarse a las mismas, células HEK293, células CHO y células HELA. Los anticuerpos contra TREM-1 también pueden producirse mediante otros procedimientos conocidos por el experto en la técnica, tales como una presentación en fagos o una presentación en levadura.

50 55 [0035] Una vez producidos, los anticuerpos pueden cribarse para determinar su unión a, por ejemplo, TREM-1 de longitud completa o mutantes de la misma usando los procedimientos descritos en los Ejemplos del documento WO2013/120553.

60 65 [0036] Los anticuerpos contra TREM-1 funcionales de la presente invención son anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 y que tienen un efecto sobre la activación de TREM-1 y la señalización cascada abajo mediante el bloqueo de TREM-1 y en el presente documento se denominan "anticuerpos contra TREM-1 funcionales". El procedimiento para identificar un anticuerpo contra TREM-1 funcional comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción informadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incuba con un agente modificador de TREM-1; (c) poner en contacto el cocultivo de (b) con un anticuerpo contra TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula es menor o mayor que la actividad medida en (b).

70 75 [0037] La "primera célula" de (a) puede ser una célula de origen hematopoyético, tal como una célula mieloide, tal como una célula T. La proteína de señalización de (a) puede ser cualquier proteína de señalización que sea capaz de formar un complejo con TREM-1. Las proteínas de señalización adecuadas incluyen DAP10, DAP12, TCR zeta, Fc gamma RIII y un receptor Fc, o parte de las mismas. La construcción informadora de (a) puede ser cualquier construcción que sea capaz de activarse mediante la proteína de señalización y generar una señal reconocible. Las construcciones informadoras adecuadas comprenden un factor de transcripción y un gen informador. La proteína de señalización puede señalar a través de un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en NFAT y NFkB. El gen informador es un gen que no se expresa de forma nativa en dicha primera célula y puede ser, pero sin limitarse a los mismos, un gen que codifica β-galactosidasa, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) o cloranfenicol transferasa. Dicha primera célula puede transfectarse con un factor de transcripción y un gen informador usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica.

[0038] La "célula informadora BWZ/hTREM-1" y la "célula informadora TE426.27" descritas en los Ejemplos son un ejemplo de una "primera célula".

5 [0039] El agente modificador de (b) puede ser un ligando de TREM-1 o un neutrófilo activado. El "anticuerpo contra TREM-1" de (c) puede ser un sobrenadante de hibridoma específico de TREM-1 o un anticuerpo purificado. La actividad medida en (d) es la señal producida por la construcción informadora. Un ejemplo de dicha señalización es la luminiscencia causada por la producción de LacZ (β -lactamasa luciferasa) impulsada por NFAT.

10 [0040] El procedimiento puede adaptarse para identificar un anticuerpo bloqueador de TREM-1. El procedimiento para identificar un anticuerpo bloqueador de TREM-1 comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción informadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incuba con un neutrófilo activado; (c) poner en contacto el cocultivo de la primera célula y el neutrófilo activado con un anticuerpo contra TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula es menor que la actividad medida en (b).

15 [0041] La presente invención se refiere a anticuerpos bloqueadores de TREM-1 que se definen en las reivindicaciones, que pueden identificarse mediante el procedimiento descrito en el presente documento para identificar un anticuerpo bloqueador. Cuando se prueba usando el procedimiento descrito anteriormente y en los Ejemplos, un anticuerpo según la presente invención puede, a una concentración de menos de 50 μ g/ml, tal como menos de 40 μ g/ml, tal como menos de 30 μ g/ml, tal como menos de 20 μ g/ml, tal como menos de 10 μ g/ml, tal como menos de 5 μ g/ml, tal como menos de 1 μ g/ml, ser capaz de reducir la actividad de dicha primera célula en un 50%, tal como 60%, tal como 70%, tal como 80%, tal como 90%, tal como 95%, tal como 100%. Un anticuerpo según la presente invención puede ser capaz de extinguir completamente la actividad de la primera célula. Cuando se prueba usando el procedimiento descrito anteriormente y en los Ejemplos, un anticuerpo según la presente invención puede, a una concentración de menos de 1 μ g/ml, tal como menos de 0,9 μ g/ml, tal como menos de 0,8 μ g/ml, tal como menos de 0,7 μ g/ml, tal como menos de 0,6 μ g/ml, tal como menos de 0,5 μ g/ml, tal como menos de 0,4 μ g/ml, tal como menos de 0,3 μ g/ml, tal como menos de 0,2 μ g/ml, ser capaz de extinguir la actividad de la primera célula.

30 [0042] Los anticuerpos bloqueadores de TREM-1 pueden identificarse por otros medios además del procedimiento descrito en el presente documento.

35 [0043] El término "anticuerpo" en el presente documento se refiere a una proteína, derivada de una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno (TREM-1) o una parte del mismo. El término "anticuerpo" descrito en el presente documento que no se refiere al anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos de longitud completa de cualquier clase o isotipo (es decir, IgA, IgE, IgG, IgM y/o IgY) y cualquier cadena sencilla o fragmento de la misma. Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, o parte del mismo, puede unirse exclusivamente a ese antígeno, o parte del mismo, o puede unirse a un número limitado de antígenos homólogos, o partes de los mismos. Los anticuerpos de longitud completa suelen comprender al menos cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas por 40 enlaces disulfuro. Una subclase de inmunoglobulinas de particular interés farmacéutico es la familia IgG. En seres humanos, la clase IgG se puede subdividir en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, según la secuencia de sus regiones constantes de cadena pesada. Las cadenas ligeras se pueden dividir en dos tipos, kappa y lambda, según las diferencias en la composición de su secuencia. Las moléculas de IgG están compuestas por dos cadenas pesadas, unidas entre sí por dos o más enlaces disulfuro, y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro. Una cadena pesada puede comprender una región variable de cadena pesada (VH) y hasta tres regiones constantes de cadena pesada (CH): CH1, CH2 y CH3. Una cadena ligera puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Las regiones VH y VL normalmente se componen de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera forman un dominio [de unión] que es capaz de interactuar con un antígeno, mientras que la región constante de un anticuerpo puede mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidos, pero sin limitarse a los mismos, varias células del sistema inmunológico (células efectoras), los receptores Fc y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

55 [0044] Se pueden aislar anticuerpos de la presente invención. El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha separado y/o recuperado de otro u otros componentes en el entorno en el que se produjo y/o que se ha purificado a partir de una mezcla de componentes presentes en el entorno en el que fue producido.

60 [0045] En el presente documento se describen ciertos fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, pero no forman parte de la presente invención. El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno, tal como TREM-1, tal como se describe en el presente documento. Entre los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (típicamente los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo), Fv de cadena sencilla (scFv; véase, por ejemplo, Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; y Huston et al.

PNAS 1988; 85:5879-5883), dsFv, Fd (normalmente el dominio VH y CH1) y dAb (normalmente un dominio VH); dominios VH, VL, VH y V-NAR; moléculas monovalentes que comprenden una única cadena VH y una única cadena VL; minicuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (ver, por ejemplo, III et al., Protein Eng 1997; 10:949-57); IgG de camello; IgNAR; así como una o más CDR aisladas o un paratopo funcional, donde las CDR aisladas o los residuos o polipéptidos de unión a antígeno pueden asociarse o unirse entre sí para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Se han descrito o revisado varios tipos de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, en Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005; 23:1126-1136; WO2005040219, y las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas 20050238646 y 20020161201. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos pueden seleccionarse para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[0046] Un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que al menos una parte de una región estructural y/o al menos una parte de una región CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. (Por ejemplo, un anticuerpo humano puede tener regiones variables en las que tanto la región estructural como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

[0047] Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse mediante un hibridoma, que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

[0048] Los anticuerpos humanos pueden aislarse a partir de bibliotecas de secuencias construidas a partir de selecciones de secuencias de la línea germinal humana, diversificadas adicionalmente con diversidad de secuencias naturales y sintéticas.

[0049] Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguida de transformación de los linfocitos con virus de Epstein-Barr.

[0050] El término "derivado de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, tal como un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

[0051] El término "anticuerpo humanizado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo químico humano/no humano que contiene una o más secuencias (regiones CDR o partes de las mismas) que se derivan de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado es, por tanto, una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que al menos residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de un anticuerpo de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad, composición de secuencia y funcionalidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Un ejemplo de dicha modificación es la introducción de una o más de las denominadas retromutaciones, que normalmente son residuos de aminoácidos derivados del anticuerpo donante. La humanización de un anticuerpo se puede llevar a cabo usando técnicas recombinantes conocidas por el experto en la técnica (ver, por ejemplo, Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, editado por Benny K.C. Lo). Una región estructural receptora humana adecuada para tanto el dominio variable de cadena ligera como el de cadena pesada puede identificarse mediante, por ejemplo, homología secuencial o estructural. Alternativamente, se pueden usar regiones estructurales receptoras fijas, por ejemplo, basándose en el conocimiento de la estructura y de las propiedades biofísicas y bioquímicas. Las regiones estructurales receptoras pueden derivar de la línea germinal o de una secuencia de anticuerpo maduro. Las regiones CDR del anticuerpo donante pueden transferirse mediante injerto de CDR. El anticuerpo humanizado injertado con CDR se puede optimizar aún más, por ejemplo, en cuanto a afinidad, funcionalidad y propiedades biofísicas mediante la identificación de posiciones en la región estructural críticas donde la reintroducción (retromutación) del residuo de aminoácido del anticuerpo donante tiene un impacto beneficioso sobre las propiedades del anticuerpo humanizado. Además de las retromutaciones derivadas del anticuerpo donante, el anticuerpo humanizado se puede modificar genéticamente mediante la introducción de residuos de la línea germinal en las regiones CDR o regiones estructurales, eliminación de epítopos inmunogénicos, mutagénesis dirigida al sitio, maduración por afinidad, etc.

[0052] Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá al menos uno, típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y en los que todos o sustancialmente todos los residuos FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina

humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender, opcionalmente, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

5 [0053] La expresión "derivado de anticuerpo humanizado" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humanizado, tal como un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

10 [0054] El término "anticuerpo químérico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de genes de 15 región constante y variable de inmunoglobulina que se originan en diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos.

20 [0055] La región cristalizable del fragmento ("región Fc"/"dominio Fc") de un anticuerpo es la región N-terminal de un anticuerpo, que comprende los dominios constantes CH2 y CH3. El dominio Fc puede interactuar con receptores de la superficie celular llamados receptores Fc, así como con algunas proteínas del sistema del complemento. La región Fc permite que los anticuerpos interactúen con el sistema inmunológico. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos pueden modificarse genéticamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más de sus propiedades funcionales, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc, la estabilidad de las proteínas y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno, o falta de las mismas, entre otras. Además, un anticuerpo de la presente invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Un anticuerpo IgG1 (que no forma parte de la presente invención reivindicada) puede portar un dominio Fc modificado que comprende una o más, y quizás todas, las siguientes mutaciones que darán como resultado una disminución de la afinidad por ciertos receptores Fc (L234A, L235E y G237A) y en la reducción de la fijación del complemento mediada por C1q (A330S y P331S), respectivamente (numeración de residuos según el índice EU).

25 [0056] Tal como se indica en las reivindicaciones, el isotipo de un anticuerpo de la presente invención es IgG4.

30 [0057] En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe más detalladamente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,677,425 por Bodmer et al.

35 [0058] La región constante puede modificarse para estabilizar el anticuerpo, por ejemplo, para reducir el riesgo de que un anticuerpo bivalente se separe en dos fragmentos VH-VL monovalentes. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S228 (numeración de residuos según el índice EU) puede mutarse a un residuo de prolina (P) para estabilizar la formación de puentes disulfuro entre cadenas pesadas en la bisagra (ver, por ejemplo, Angal et al., Mol Immunol. 1995; 30: 105-8).

40 [0059] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos también pueden definirse en términos de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR). El término "región determinante de complementariedad" o "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un anticuerpo en las que se sitúan los residuos de aminoácidos implicados en la unión al antígeno. La región de hipervariabilidad o CDR puede identificarse como las regiones con la mayor variabilidad en las alineaciones de aminoácidos de los dominios variables del anticuerpo. Se pueden usar bases de datos para la identificación de las CDR, tales como la base de datos Kabat, definiéndose las CDR, por ejemplo, como que comprenden los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-59 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat et al. 1991; Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH n.º 91-3242) Alternativamente, las CDR pueden definirse como aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (residuos 26-33 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196: 901-917). Normalmente, la numeración de residuos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el procedimiento descrito en Kabat et al., *supra*. Frases como "posición de Kabat", "residuo de Kabat" y "según Kabat" en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento o inserción en una región estructural (FR) o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (residuos 52a, 52b y 52c según Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración Kabat de residuos se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

65 [0060] El término "región estructural" ("framework región") o residuos "FR" se refiere a aquellos residuos de aminoácidos de VH o VL que no están dentro de las CDR, tal como se define en el presente documento.

[0061] El anticuerpo mAb 0170 tiene una secuencia de cadena pesada variable, tal como se muestra en la SEQ ID

5 NO: 2 y una secuencia de cadena ligera variable, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo de la presente invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable, tal como se describe en las reivindicaciones dependientes. El anticuerpo mAb 0170 tiene las secuencias CDR mostradas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 2 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 3.

10 [0062] La cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (TYAMH) de SEQ ID NO: 2, en la que uno de estos aminoácidos puede estar sustituido por un aminoácido diferente.

15 [0063] La cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50 a 68 (RIRTKSSNYATYYADSVKD) de SEQ ID NO: 2, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

20 [0064] La cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR3 de los aminoácidos 101 a 110 (DMGQRRQFAY) de SEQ ID NO: 2, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

25 [0065] La cadena ligera de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24 a 38 (RASESVDTFDYSFLH) de SEQ ID NO: 3, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

30 [0066] La cadena ligera de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR2 de los aminoácidos 54 a 60 (RASNLES) de SEQ ID NO: 3, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

35 [0067] La cadena ligera de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDR3 de los aminoácidos 93 a 101 (QQSNEDPYT) de SEQ ID NO: 3, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

40 [0068] El anticuerpo mAb 0170 tiene una secuencia de cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de cadena ligera, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede comprender esta secuencia de cadena pesada o esta secuencia de cadenas ligeras. La cadena pesada o ligera del anticuerpo de la presente invención (que es como se define en las reivindicaciones), o ambas, pueden ser una variante del mAb 0170. El anticuerpo mAb 0170 tiene las secuencias de CDR que se muestran en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 2 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 secuencias de CDR.

45 [0069] La cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) puede comprender una secuencia CDRH3 de los aminoácidos 101 a 110 (DMGIRQQFAY) de SEQ ID NO: 2, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden estar sustituidos por un aminoácido diferente.

50 [0070] El término "antígeno" (Ag) se refiere a la entidad molecular utilizada para la inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo (Ab) que reconoce el Ag. En el presente documento, Ag se denomina de forma más amplia y generalmente pretende incluir moléculas diana que son reconocidas específicamente por el Ab, incluyendo así fragmentos o imitadores de la molécula utilizada en el proceso de inmunización, u otro proceso, por ejemplo, presentación en fagos, utilizados para generar el Ab.

55 [0071] El término "epítopo", tal como se usa en el presente documento, se define en el contexto de una interacción molecular entre un "polipéptido de unión a antígeno", tal como un anticuerpo (Ab), y su antígeno correspondiente (Ag). Generalmente, "epítopo" se refiere al área o región de un Ag al que se une específicamente un Ab, es decir, el área o región en contacto físico con el Ab. El contacto físico se puede definir mediante varios criterios (por ejemplo, una distancia límite de 2-6 Å, tal como 3 Å, tal como 4 Å, tal como 5 Å; o accesibilidad al disolvente) para los átomos en las moléculas de Ab y Ag. Un epítopo de proteína puede comprender residuos de aminoácidos en el Ag que están directamente involucrados en la unión a un Ab (también llamado componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente involucrados en la unión, tales como residuos de aminoácidos del Ag que están efectivamente bloqueados por el Ab, es decir, residuos de aminoácidos dentro de la "superficie excluida del disolvente" y/o la "huella" del Ab.

60 [0072] El término epítopo en el presente documento comprende ambos tipos de región de unión en cualquier región particular de TREM-1 que se une específicamente a un anticuerpo contra TREM-1. TREM-1 puede comprender varios epítopos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, epítopos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos ubicados cerca uno del otro en la conformación madura de TREM-1 y epítopos postraduccionales que consisten, ya sea en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente a TREM-1, tales como los grupos de carbohidratos.

5 [0073] El epítopo para un par determinado de anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) se puede describir y caracterizar a diferentes niveles de detalle utilizando una variedad de procedimientos experimentales y computacionales de mapeo de epítopos. Los procedimientos experimentales incluyen mutagénesis, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno deuterio (HX-MS, Hydrogen deuterium eXchange Mass Spectrometry) y varios procedimientos de unión competitiva; procedimientos que son conocidos en la técnica. Como cada procedimiento se basa en un principio único, la descripción de un epítopo está íntimamente ligada al procedimiento mediante el cual se ha determinado. Por lo tanto, dependiendo del procedimiento de mapeo de epítopos empleado, el epítopo para un par de Ab/Ag determinado puede describirse de manera diferente.

10 [0074] En su nivel más detallado, el epítopo para la interacción entre Ag y Ab puede describirse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción Ag-Ab, así como la información sobre sus contribuciones relativas a la termodinámica de unión. En un nivel menos detallado, el epítopo se puede caracterizar por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre Ag y Ab. En un nivel aún menos detallado, el epítopo se puede caracterizar por los residuos de aminoácidos que comprende según lo definido por un criterio específico, tal como la distancia entre átomos o la accesibilidad al disolvente de los átomos en el complejo Ab:Ag. En un nivel aún menos detallado, el epítopo se puede caracterizar mediante su función, por ejemplo mediante unión competitiva con otros Abs. El epítopo también se puede definir de manera más genérica como que comprende residuos de aminoácidos cuya sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre Ab y Ag.

15 [0075] En el contexto de una estructura cristalina derivada de rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, por ejemplo un fragmento Fab, y su Ag, el término epítopo se define aquí, a menos que se especifique lo contrario o se contradiga por el contexto, específicamente como residuos de TREM-1 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es de hidrógeno) dentro de una distancia de, por ejemplo, 4 Å de un átomo pesado en el Ab.

20 [0076] Del hecho de que las descripciones y definiciones de epítopos, dependiendo del procedimiento de mapeo de epítopos utilizado, se obtienen en diferentes niveles de detalle, se deduce que la comparación de epítopos para diferentes Abs en el mismo Ag se puede realizar de manera similar a diferentes niveles de detalle.

25 [0077] Se dice que los epítopos descritos a nivel de aminoácidos, por ejemplo determinados a partir de una estructura de rayos X, son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se dice que los epítopos se superponen si los epítopos comparten al menos un aminoácido. Se dice que los epítopos están separados (únicos) si los epítopos no comparten ningún residuo de aminoácido.

30 [0078] Los epítopos también se pueden definir indirectamente, mediante la comparación de la cinética de unión de anticuerpos a TREM-1 humano de tipo salvaje con la de variantes de TREM-1 humana que tienen mutaciones de alanina en epítopos anticipados. La afinidad disminuida o la unión anulada de un anticuerpo a variantes de TREM-1 humana en las que un residuo de aminoácido ha sido reemplazado por un residuo de alanina indica que el aminoácido mutado contribuye a la interacción entre dicho anticuerpo y TREM-1 humana de tipo salvaje. Este enfoque proporciona una identificación negativa del epítopo. El procedimiento se ve comprometido a la hora de definir eficazmente el epítopo por el hecho de que el plegamiento incorrecto o no despliegue de la proteína daría resultados similares a los de la anulación de la interacción. El análisis puede complementarse con análisis comparativos mutacionales de ganancia de función de una proteína diana ortóloga (por ejemplo, TREM-1 de mono cynomolgus), si existe un anticuerpo con reacción cruzada. La comparación definirá las diferencias de epítopos entre el anticuerpo que no reacciona de forma cruzada con, por ejemplo, TREM-1 de mono cynomolgus y el anticuerpo de reacción cruzada.

35 [0079] La identificación indirecta del epítopo también se puede proporcionar mediante la medición de la unión del anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) a variantes del antígeno de tipo salvaje (TREM-1). Si un anticuerpo o fragmento del mismo se une, por ejemplo, a TREM-1 humana pero no de mono cynomolgus y si dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de unirse a una variante parcialmente humanizada de TREM-1 de mono cynomolgus, entonces esta unión recuperada indica que el residuo o residuos de aminoácidos sustituidos son importantes para la interacción del anticuerpo con el antígeno. De la misma manera, una mayor afinidad por las variantes humanizadas del TREM-1 del mono cynomolgus, de un anticuerpo anti-TREM-1 humana (o su fragmento Fab) que tiene una unión más débil al TREM-1 del mono cynomolgus en comparación con TREM-1 humana, puede proporcionar información sobre la identidad de los residuos que componen el epítopo de unión.

40 [0080] El efecto de las mismas mutaciones en cualquier anticuerpo con reacción cruzada determinado hace que sea posible discriminar entre un posible plegamiento incorrecto de proteínas (unión anulada a ambos anticuerpos) y la pérdida de interacción en TREM-1 humana (unión a uno de los anticuerpos y anulación de unión al otro anticuerpo), al tiempo que proporciona información inequívoca sobre las diferencias de epítopo entre el anticuerpo que no reacciona de forma cruzada y el anticuerpo que reacciona de forma cruzada a nivel de aminoácidos.

45 [0081] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces de unirse a variantes de TREM-1 humana según

se determina usando, por ejemplo, resonancia de plasmiones superficiales.

[0082] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces de unirse a variantes de TREM-1 de mono cynomolgus según se determina usando, por ejemplo, resonancia de plasmiones superficiales.

[0083] Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1, en donde dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente (i) a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A21, T22, K23, L24, T25, E26 y (ii) a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, 157, 158, R59, D60, G61, E62, M63, P64, K65, T66, L67, A68, C69, T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, I85 y (iii) a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C113, V114, 1115, Y116, Q117, P118 y P119 de TREM-1 humana.

[0084] Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos D38 a F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana), según se determina usando, por ejemplo, HX-MS o difracción de rayos X.

[0085] Un anticuerpo de la presente invención puede tener un epítopo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los residuos de aminoácidos D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 y L45 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana) y uno, dos o todos los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en E46, K47 y F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana), según se determina usando, por ejemplo, HX-MS o difracción de rayos X.

[0086] Un anticuerpo de la presente invención puede tener un epítopo que comprende uno, dos, tres o todos los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en D42, E46, D92 y H93 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana), según se determinado utilizando variantes de TREM-1 y resonancia de plasmiones superficiales.

[0087] Un anticuerpo de la presente invención puede tener un epítopo que comprende al menos los residuos de aminoácidos E46 y/o D92 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana), según se determina usando variantes de TREM-1 y resonancia de plasmiones superficiales.

[0088] Un anticuerpo de la presente invención puede comprender además uno, dos o todos los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L31, I86 y V101 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana).

[0089] Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos E19 a L26 de TREM-1 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 17), según se determina usando, por ejemplo, HX-MS o difracción de rayos X.

[0090] Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1 humana, en el que el epítopo de dicho anticuerpo comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o todos los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48 y A49 de SEQ ID NO: 1.

[0091] Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1 humana, en el que el epítopo de dicho anticuerpo comprende el D42 de SEQ ID NO: 1. Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1 humana, en el que el epítopo de dicho anticuerpo comprende el E46 de la SEQ ID NO: 1. El epítopo de dicho anticuerpo puede comprender el V39, C41, D42, Y43, L45 de la SEQ ID NO: 1. El epítopo de dicho anticuerpo puede comprender el E46, K47 y A49 de SEQ ID NO: 1. El epítopo de dicho anticuerpo puede comprender además el F48 de SEQ ID NO: 1.

[0092] La definición del término "paratopo" se deriva de la definición anterior de "epítopo" invirtiendo la perspectiva. Por tanto, el término "paratopo" se refiere al área o región del anticuerpo a la que se une específicamente un antígeno, es decir, con la que hace contacto físico con el antígeno.

[0093] En el contexto de una estructura cristalina derivada de rayos X, definida por las coordenadas espaciales de un complejo entre un anticuerpo, tal como un fragmento Fab, y su antígeno, el término paratopo se define en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario o se contradiga por el contexto, específicamente como residuos de antígeno caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es de hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å de un átomo pesado en TREM-1.

[0094] El epítopo y el paratopo para un par determinado de anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) se pueden identificar mediante procedimientos de rutina. Por ejemplo, la ubicación general de un epítopo puede determinarse evaluando la capacidad de un anticuerpo para unirse a diferentes fragmentos o polipéptidos variantes de TREM-1. Los aminoácidos específicos dentro de TREM-1 que hacen contacto con un anticuerpo (epítopo) y los aminoácidos específicos en un anticuerpo que hacen contacto con TREM-1 (paratopo) también se pueden determinar usando procedimientos de rutina. Por ejemplo, se pueden combinar el anticuerpo y la molécula diana y se puede cristalizar el complejo Ab:Ag. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción

entre el anticuerpo y su diana.

[0095] Los anticuerpos que se unen al mismo antígeno se pueden caracterizar con respecto a su capacidad para unirse a su antígeno común de manera simultánea y se pueden someter a "unión competitiva"/"binning". En el presente contexto, el término "binning" se refiere a un procedimiento de agrupar anticuerpos que se unen al mismo antígeno. La "binning" de anticuerpos puede basarse en la unión competitiva de dos anticuerpos a su antígeno común en ensayos basados en técnicas estándar, tales como resonancia de plasmones superficiales (SPR), ELISA o citometría de flujo.

5 [0096] El "bin" de un anticuerpo se define utilizando un anticuerpo de referencia. Si un segundo anticuerpo no puede unirse a un antígeno al mismo tiempo que el anticuerpo de referencia, se dice que el segundo anticuerpo pertenece al mismo "bin" que el anticuerpo de referencia. En este caso, el anticuerpo de referencia y el segundo anticuerpo se unen competitivamente a la misma parte de un antígeno y se denominan "anticuerpos competitivos". Si un segundo anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno al mismo tiempo que el anticuerpo de referencia, se dice que el segundo anticuerpo pertenece a un "bin" separado. En este caso, el anticuerpo de referencia y el segundo anticuerpo no se unen competitivamente a la misma parte de un antígeno y se denominan "anticuerpos no competitivos".

10 [0097] La "binning" de anticuerpos no proporciona información directa sobre el epítopo. Los anticuerpos competitivos, es decir, anticuerpos que pertenecen al mismo "bin", pueden tener epítopos idénticos, epítopos superpuestos o incluso epítopos separados. Este último es el caso si el anticuerpo de referencia unido a su epítopo en el antígeno ocupa el espacio necesario para que el segundo anticuerpo entre en contacto con su epítopo en el antígeno ("impedimento estérico"). Los anticuerpos no competitivos generalmente tienen epítopos separados.

15 [0098] Un anticuerpo de la presente invención puede competir con el mAb 0170 por la unión a TREM-1 humana. Un anticuerpo de la presente invención puede competir con el mAb 0170 por la unión al TREM-1 del mono cynomolgus. En otras palabras, un anticuerpo de la presente invención puede pertenecer al mismo "bin" que mAb 0170.

20 [0099] El término "afinidad de unión" en el presente documento se refiere a una medición de la fuerza de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno. El término "afinidad de unión" se utiliza para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca).

25 [0100] La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno, a través de una interacción monovalente, puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_D). A su vez, K_D puede determinarse midiendo la cinética de formación y disociación de complejos, por ejemplo mediante el procedimiento SPR. Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se denominan constante de velocidad de asociación k_a (o k_{on}) y constante de velocidad de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. K_D está relacionado con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

30 [0101] Siguiendo la definición anterior, las afinidades de unión asociadas con diferentes interacciones moleculares, tales como la comparación de la afinidad de unión de diferentes anticuerpos para un antígeno determinado, se pueden comparar mediante la comparación de los valores de K_D para los complejos anticuerpo/antígeno individuales.

35 [0102] Un anticuerpo de la presente invención puede unirse a TREM-1 humana con una afinidad (K_D) que es 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-9} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos, 1×10^{-11} M o menos, 1×10^{-12} M o menos o 1×10^{-13} M o menos, según lo determinado mediante resonancia de plasmones de superficie. Un anticuerpo de la presente invención puede unirse a TREM-1 de mono cynomolgus con una afinidad (K_D) que es 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-9} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos, 1×10^{-11} M o menos, 1×10^{-12} M o menos o 1×10^{-13} M o menos, según se determine mediante resonancia de plasmón de superficie.

40 [0103] El término "especificidad de unión" en el presente documento se refiere a la interacción de una molécula, tal como un anticuerpo, o fragmento del mismo, con un único antígeno exclusivo, o con un número limitado de antígenos (o epítopos) altamente homólogos. Por el contrario, los anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 no son capaces de unirse a moléculas diferentes. Los anticuerpos según la invención pueden no ser capaces de unirse a Nkp44, la proteína relacionada con p44 de las células asesinas naturales.

45 [0104] La especificidad de una interacción y el valor de una constante de unión en equilibrio se pueden determinar directamente mediante procedimientos bien conocidos. Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de ligandos (tales como anticuerpos) para unirse a sus dianas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y la afinidad de unión del anticuerpo también pueden evaluarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como SPR.

50 [0105] Se puede realizar un ensayo de unión competitiva en el que la unión del anticuerpo a la diana se compara con la unión de la diana mediante otro ligando de esa diana, tal como otro anticuerpo.

55 [0106] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones y formulaciones (que no forman parte de la presente invención) que comprenden moléculas de la presente invención, tales como los anticuerpos contra

TREM-1, polinucleótidos, vectores y células descritos en el presente documento. Tal como se indica en las reivindicaciones, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 [0107] La formulación farmacéutica puede comprender dicho anticuerpo contra TREM-1 que está presente en una concentración de 0,25 mg/ml a 250 mg/ml, tal como una concentración de 10 a 200 mg/ml, y en la que dicha formulación tiene una pH de 2,0 a 10,0, tal como un pH de 4,0 a 8,0. La formulación puede comprender además uno o más de un sistema tampón, un conservante, un agente de tonicidad, un agente quelante, un estabilizador y/o un tensioactivo, así como diversas combinaciones de los mismos. El experto conoce bien el uso de conservantes, agentes isotónicos, agentes quelantes, estabilizadores y tensioactivos en composiciones farmacéuticas. Se puede hacer referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.^a edición, 1995.

10 [0108] En una realización, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa. Una formulación de este tipo es habitualmente una solución o una suspensión, pero también puede incluir coloides, dispersiones, emulsiones y materiales multifásicos. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 15 50 % p/p de agua. Asimismo, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos un 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50 % p/p de agua.

20 [0109] En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

25 [0110] La formulación farmacéutica puede comprender una solución acuosa de dicho anticuerpo y un tampón, en la que el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o superior, y en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, tal como un pH de 4,0 a 8,0.

30 [0111] En otro aspecto, los anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos (tal como se definen en las reivindicaciones) son para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como las siguientes: enfermedad inflamatoria intestinal (EII), Enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), síndrome del intestino irritable, artritis reumatoide (AR), psoriasis, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, diabetes tipo I, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple (EM), miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmune, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, 35 dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjogrens, nefritis autoinmune, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunes que son el resultado de una inflamación aguda o crónica.

40 [0112] Los anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal. La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es una enfermedad que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, provocando una amplia variedad de síntomas. La EII causa principalmente dolor abdominal, diarrea (que puede ser con sangre), vómitos o pérdida de peso, pero también puede causar complicaciones fuera del tracto gastrointestinal, tales como erupciones cutáneas, artritis, inflamación de los ojos, fatiga y falta de concentración. Los pacientes con EII se pueden dividir en dos clases principales, aquellos con colitis ulcerosa (CU) y aquellos con enfermedad de Crohn (EC). La EC generalmente afecta el íleon y el colon, puede afectar cualquier región del intestino, pero a menudo es discontinua (áreas enfocadas de la enfermedad diseminadas por todo el intestino). La CU siempre afecta el recto (colónico) y es más continua. En la EC, la inflamación es transmural, lo que da lugar a abscesos, fistulas y estenosis, mientras que en la CU, la inflamación suele limitarse a la mucosa. No se conoce ninguna cura farmacéutica o quirúrgica para la enfermedad de Crohn, mientras que algunos pacientes con CU pueden curarse mediante la extirpación quirúrgica del colon. Las opciones de tratamiento se limitan a controlar los síntomas, mantener la remisión y prevenir las recaídas. La eficacia en la enfermedad inflamatoria intestinal en la clínica se puede medir como una reducción en la puntuación del Índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI, *Crohn's Disease Activity Index*) para la EC, que es una escala de puntuación basada en pruebas de laboratorio y un cuestionario de calidad de vida. En modelos animales, la eficacia se mide principalmente por el aumento de peso y también por el índice de actividad de la enfermedad (DAI, *Disease Activity Index*), que es una combinación de la consistencia de las heces, el peso y la sangre en las heces.

45 [0113] Los anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con artritis reumatoide. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a casi, si no a todo, el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la articulación, lo que provoca dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Esta inflamación es consecuencia de que las células inflamatorias invaden las articulaciones y estas células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado, esta inflamación puede provocar daños graves en los huesos y cartílagos y deterioro de las articulaciones y dolor intenso, entre otros efectos fisiológicos. La articulación afectada puede perder su forma y alineación, lo que provoca dolor y pérdida de movimiento.

50 [0114] Hay varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de

artritis inducida por colágeno (CIA, *collagen-induced arthritis*), los ratones desarrollan una artritis inflamatoria que se asemeja a la artritis reumatoide humana. Dado que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto la convierte en un modelo adecuado para detectar potenciales compuestos antiinflamatorios humanos. La eficacia en este modelo se mide por la disminución de la inflamación de las articulaciones. La eficacia en la AR en la clínica se mide por la capacidad de reducir los síntomas en los pacientes, que se mide como una combinación de inflamación de las articulaciones, velocidad de sedimentación globular, niveles de proteína C reactiva y niveles de factores séricos, tales como los anticuerpos anti-proteína citrulinada.

[0115] Los anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con psoriasis. La psoriasis es un trastorno inflamatorio de la piel mediado por células T que puede causar un malestar considerable. Es una enfermedad para la que actualmente no existe cura y afecta a personas de todas las edades. Aunque las personas con psoriasis leve a menudo pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo requieren tratamientos con luz ultravioleta o terapia inmunosupresora sistémica. Desafortunadamente, los inconvenientes y riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes suelen tener recurrencia de la psoriasis y, en algunos casos, hay un efecto rebote poco después de suspender el tratamiento inmunosupresor. Un modelo de psoriasis desarrollado recientemente basado en la transferencia de células T CD4+ mimetiza muchos aspectos de la psoriasis humana y, por lo tanto, puede usarse para identificar compuestos adecuados para su uso en el tratamiento de la psoriasis. Davenport et al., *Internat. Inmunofarmacol* 2:653-672, 2002). La eficacia en este modelo se mide mediante la reducción de la patología de la piel utilizando un sistema de puntuación. De manera similar, la eficacia en pacientes se mide por una disminución de la patología de la piel.

[0116] Los anticuerpos contra TREM-1 de la presente invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con artritis psoriásica. La artritis psoriásica (AP) es un tipo de artritis inflamatoria que aparece en un subconjunto de pacientes con psoriasis. En estos pacientes, la patología/síntomas de la piel van acompañados de una inflamación de las articulaciones similar a la que se observa en la artritis reumatoide. Presenta áreas rojas, abultadas y moteadas de inflamación de la piel con descamación. La psoriasis suele afectar a las puntas de los codos y las rodillas, el cuero cabelludo, el ombligo y alrededor de las zonas genitales o el ano. Aproximadamente el 10% de los pacientes que padecen psoriasis también desarrollan una inflamación asociada de las articulaciones.

[0117] El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro animal que lo necesite. Se espera que dicho sujeto haya sido sometido a un examen físico por parte de un médico o veterinario, que haya dado un diagnóstico provisional o definitivo que indique que el uso de dicho tratamiento es beneficioso para la salud de dicho sujeto humano u otro animal. El momento y la finalidad de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, según muchos factores, tales como el status quo de la salud del sujeto. De este modo, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

[0118] En términos de la presente invención, los tratamientos profilácticos, paliativos, sintomáticos y/o curativos pueden representar aspectos separados de la presente invención.

[0119] Un anticuerpo de la presente invención puede ser para administración por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, tal como por vía intramuscular, tal como por vía subcutánea. Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención puede ser para administración por vía no parenteral, tal como por vía peroral o tópica. Un anticuerpo de la presente invención puede ser para administración profiláctica. Un anticuerpo de la presente invención puede ser para administración terapéutica (a demanda).

[0120] Tal como se demuestra en el presente documento, se observó que la sustitución de residuos cargados negativamente de las regiones CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 (la cadena ligera variable de mAb 0170) influye en la viscosidad del mAb. El mAb descrito en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) es una variante del mAb 0170 que tiene una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera del mAb 0170, a saber SEQ ID NO: 3, comprende mutaciones en las que residuos cargados negativamente en las regiones CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 están sustituidos por residuos no cargados. Por consiguiente, la divulgación proporciona una variante de mAb 0170 (que no forma parte de la presente invención) que comprende sustituir uno cualquiera o cualquier combinación de los residuos D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 de SEQ ID NO: 3 por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína y tirosina. Dicho de otro modo, una realización interesante descrita en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) está dirigida a un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende la SEQ ID NO: 2 (o una variante de la misma) como una cadena pesada y como una cadena ligera que comprende una variante de SEQ ID NO: 3 en donde cualquiera o cualquier combinación de los residuos D1, D30, D33, D74, D98, E27, E97 de SEQ ID NO: 3 está mutado a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína y tirosina. Estas mutaciones se denominarán mutaciones de " parche de carga". En una realización preferida de la divulgación (que no forma parte de la presente invención), al menos uno o ambos de E27 y E97 de las regiones CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 están sustituidos por residuos de aminoácidos no cargados, tales como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína y tirosina. En el anticuerpo de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, E27 de las regiones CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 puede mutarse a glutamina y E97 puede

5 sustituirse por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en serina y glutamina. Alternativamente, en el anticuerpo de la presente invención definido en las reivindicaciones, E27 puede permanecer sin mutar y E97 puede mutarse con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en serina y glutamina. En el anticuerpo de la presente invención definido en las reivindicaciones, el residuo E97 puede permanecer sin mutar y E27 puede sustituirse por glutamina.

10 [0121] Otro aspecto de la presente invención se basa en la observación de que se formaron dímeros Fab-Fab debido a interacciones en el área del paratopo. Dado que los mAb comprenden dos Fab, se imaginó que los mAb podrían multimerizarse, lo que podría tener un impacto en las propiedades de viscosidad. Por lo tanto, la presente divulgación describe además la mutación de residuos en el área de interacción Fab-Fab de SEQ ID NO: 2 (a saber, en el área de cadena pesada variable de mAb 0170) para reducir la dimerización de Fab-Fab. Estas mutaciones se denominan mutaciones de "interacción Fab-Fab". Un aspecto de la divulgación (que no forma parte de la presente invención) está dirigido a sustituir cualquiera de los residuos Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 y R106 de SEQ ID NO: 2 o F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 de SEQ. ID NO 3 por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina. Dicho de otro modo, una realización interesante descrita en el presente documento (que no forma parte de la presente invención) está dirigida a un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una variante de SEQ ID NO: 2 en la que cualquiera de los residuos Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 y R106 de SEQ ID NO: 2 o F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 de SEQ. ID NO 3 (mutaciones de "interacción Fab-Fab") está sustituido por otro aminoácido, tal como un aminoácido natural, preferiblemente un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina. Preferiblemente, en la presente divulgación (que no forma parte de la presente invención), al menos uno de los residuos A59 y N57 SEQ ID NO: 2 se muta a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina, más preferiblemente, serina o tirosina. En el anticuerpo de la presente invención definido en las reivindicaciones, A59 puede permanecer sin mutar y N57 puede mutarse a serina. En el anticuerpo de la presente invención definido en las reivindicaciones, N57 puede permanecer sin mutar y A59 puede mutarse a tirosina. En al menos una realización de la divulgación (que no forma parte de la presente invención), tanto A59 como N57 están mutados a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina, más preferiblemente, serina o tirosina.

15 [0122] En una realización interesante de la divulgación (que no forma parte de la presente invención), i) al menos un residuo cargado negativamente de las regiones CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 se muta a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína y tirosina y ii) al menos un residuo de los residuos Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 y R106 de SEQ ID NO: 2 o F32, D33, Y34, Y53, R54, D98 de SEQ. ID NO 3 (mutaciones de "interacción Fab-Fab") se muta a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina.

20 [0123] En una realización adecuada de la divulgación (que no forma parte de la presente invención), uno o ambos de E27 y E97 de SEQ ID NO: 3 están mutados a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína y tirosina y uno o ambos de A59 y N57 de SEQ ID NO: 2 están mutados a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina, treonina, cisteína, lisina, arginina, triptófano, histidina y tirosina, más preferiblemente, serina o tirosina.

25 [0124] Un aspecto adicional de la divulgación (que no forma parte de la presente invención) se basa en la observación de que una sustitución de Ala en la posición Y90 de SEQ ID NO 1 de TREM-1 mejoraba la afinidad de SEQ. ID NO 3 a TREM-1. Se descubrió que el Y90 interactuaba con un residuo de fenilalanina de SEQ ID NO: 3. La mutación de SEQ ID NO: 3 para mejorar la interacción Fab-TREM-1 se denomina mutaciones de interacción Fab-TREM-1. En el anticuerpo de la presente invención definido en las reivindicaciones, la fenilalanina en la posición 32 de SEQ ID NO: 3 puede mutar a alanina o serina.

30 [0125] Las mutaciones de tipo parche de carga en la CDR1 y CDR3 de SEQ ID NO: 3 redujeron el radio hidrodinámico (Rh), mientras que las mutaciones en la región de interacción Fab-Fab aumentaron el Rh (Figura 6). Las mutaciones en el sitio de "interacción Fab-TREM-1" no afectaron al Rh y tuvieron muy poco efecto sobre la viscosidad (Figuras 6 y 1, Tablas 3C y 3E).

Tabla 1: Resumen de variantes de mAb SEQ ID No (0170) generadas. L = cadena ligera, H = cadena pesada.

	ID de mAb	Comprenden la Secuencia ID No.	Mutación(es) en SEQ ID NO: 2 o 3	Cadena
Mutaciones de tipo parche de carga	0317	SEQ ID NO: 4 y 2	E27Q, E97S	L
	0318	SEQ ID NO: 5 y 2	E27Q, E97Q	L
	0319	SEQ ID NO: 6 y 2	E97S	L
	0320	SEQ ID NO: 7 y 2	E97Q	L
	0321	SEQ ID NO: 8 y 2	E27Q	L
Mutaciones de interacción Fab-Fab	0324	SEQ ID NO: 11 y 3	A59Y	H
	0325	SEQ ID NO: 12 y 3	N57S	H
	0326	SEQ ID NO: 13 y 3	A59Y, N57S	H
Mutaciones de interacción Fab-TREM-1	0322	SEQ ID NO: 9 y 2	F32A	L
	0323	SEQ ID NO: 10 y 2	F32S	L
Mutaciones de tipo parche de carga e interacción Fab-TREM-1	0330	SEQ ID NO: 14 y 2	F32A, E27Q, E97Q	L
Mutaciones de tipo parche de carga e interacción Fab-Fab	0332	SEQ ID NO: 15 y 5	A59Y/E27Q, E97Q	H/L
Parche de carga, interacción Fab-TREM-1 e interacción Fab-Fab	0333	SEQ ID NO: 14 y 16	A59Y/F32A, E27Q, E97Q	H/L

[0126] Se determinó la viscosidad para las variantes de mAb 0170 mediante DLS o microrreología y se observó que tanto las mutaciones de tipo «parche de carga» como las mutaciones de «interacción Fab-Fab» redujeron la viscosidad. Se descubrió que la variante 0318 de mAb, que comprende las mutaciones de tipo parche de carga E27Q y E97Q, tenía la viscosidad más baja.

[0127] Se determinaron la cinética de unión de las variantes 0170 de mAb hacia TREM-1-Fc humano y TREM-1-Fc de cynomolgus, respectivamente. Se encontró que todas las variantes de mAb 0170 tenían afinidad similar hacia TREM-1-Fc humano. De manera interesante, se descubrió que la variante de mAb, SEQ ID NO: 9 que comprende una mutación de «interacción Fab-TREM-1» había aumentado la afinidad hacia TREM-1-Fc de cynomolgus (Tabla 2).

Tabla 2: Afinidad de las variantes de mAb anti-TREM-1 hacia TREM-1-Fc humano y TREM-1-Fc de cynomolgus, respectivamente.

TREM-1-Fc humano				TREM-1-Fc de cynomolgus		
mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
0170	3E+06	5E-04	0,1	0,3E+06	4E-04	2
0317	4E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	7E-04	3
0318	3E+06	7E-04	0,2	0,3E+06	7E-04	2
0319	4E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	6E-04	2
0320	4E+06	7E-04	0,2	0,2E+06	6E-04	3
0321	3E+06	6E-04	0,2	0,3E+06	6E-04	2
0322	3E+06	3E-04	0,1	0,6E+06	1E-04	0,1
0323	2E+06	6E-04	0,3	0,4E+06	2E-04	0,6
0324	3E+06	8E-04	0,3	0,2E+06	6E-04	4
0325	4E+06	3E-04	0,08	0,2E+06	6E-04	1
0326	3E+06	7E-04	0,2	0,2E+06	3E-04	5
0330	2E+06	3E-04	0,1	0,6E+06	7E-05	0,1
0332	3E+06	1E-03	0,4	0,2E+06	8E-04	4
0333	2E+06	5E-04	0,3	0,4E+06	1E-04	0,3

5 [0128] En una realización con afinidad mejorada hacia TREM-1 y que tiene baja viscosidad, las mutaciones de SEQ ID NO: 9 se combinaron con las mutaciones en SEQ ID NO: 5 para generar la cadena ligera de SEQ ID NO: 14 y las mutaciones de la cadena ligera de SEQ ID NO: 14 se combinaron además con las mutaciones de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16. La afinidad aumentada hacia TREM-1-Fc de cynomolgus se mantuvo para las variantes de mAb que comprendían las mutaciones combinadas de SEQ ID NO: 14 y las mutaciones no afectaron negativamente la afinidad hacia TREM-1-Fc humano. Por consiguiente, en la presente invención se prevén realizaciones que comprenden tanto mutaciones de tipo " parche de carga" como mutaciones de "interacción Fab-TREM-1", así como realizaciones que comprenden tanto mutaciones de tipo " parche de carga" como mutaciones de "interacción Fab-Fab", así como realizaciones que comprenden tanto mutaciones de "interacción Fab-Fab" como mutaciones de "interacción Fab-TREM-1" y realizaciones que comprenden mutaciones de "interacción Fab-Fab", mutaciones de "interacción Fab-TREM-1" y mutaciones de tipo " parche de carga".

10

Tabla 3A Viscosidad frente a concentración de proteína de mAb 0170, 0317 y 0318

mAb					
0170		0317		0318	
Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (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				

15 Tabla 3B: Viscosidad frente a concentración de proteína de mAb 0319 y 0320 y 321.

mAb					
0319		0320		0321	
Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (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

Tabla 3C: Viscosidad frente a concentraciones de proteína de mAb 0322, 0323 y 324.

mAb					
0322		0323		0324	
Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (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

Tabla 3D: Viscosidad frente a concentraciones de proteína de mAb 0325, 0326 y 0330.

mAb					
0325		0326		0330	
Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (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				

Tabla 3E Viscosidad frente a concentraciones de proteína de mAb 0332 y 0333.

mAb			
0332		0333	
Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (cP)	Concentración de proteína (mg/ml)	Viscosidad (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

5 [0129] Las realizaciones adicionales de la presente invención se describen a continuación:
 El anticuerpo de la presente invención que es capaz de unirse a y de bloquear TREM-1 de SEQ ID NO: 1 (tal como se define en las reivindicaciones), se puede caracterizar por que el anticuerpo que tiene una viscosidad inferior a 5 cP a una concentración de 50 mg/ml, tal como inferior a 4 cP, preferiblemente, inferior a 3 cP (en el que el procedimiento de determinación de las condiciones de viscosidad frente a la concentración de proteína es convencional o tal como se describe en el presente documento).

10 [0130] El anticuerpo de la presente invención que es capaz de unirse a o bloquear TREM-1 (tal como se define en las reivindicaciones), se puede caracterizar por que el anticuerpo que tiene una viscosidad inferior a 5 cP a una concentración de 80 mg/ml, preferiblemente inferior a 4 cP (en el que el procedimiento de determinación de las condiciones de viscosidad frente a la concentración de proteína es convencional o tal como se describe en el presente documento).

15 [0131] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede bloquear la función de TREM-1 con una KD para SEQ ID NO: 1 inferior a 0,5 nM, tal como inferior a 0,4 nM, preferiblemente, de 0,3 nM o

inferior.

[0132] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede unirse de manera competitiva a mAb 0170 para la unión con SEQ ID NO: 1 y puede tener un perfil de viscosidad de manera que:

- 5 (a) el anticuerpo tiene una viscosidad inferior a 5 cP a una concentración de 50 mg/ml, tal como inferior a 4 cP, preferiblemente, inferior a 3 cP; o
 (b) el anticuerpo tiene una viscosidad inferior a 5 cP a una concentración de 80 mg/ml, preferiblemente inferior a 4 cP.

10 [0133] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) que es capaz de unirse de manera específica a y de bloquear TREM-1 puede contener mutaciones de «interacción Fab-Fab» de la SEQ ID NO: 2 descritas en el presente documento.

15 [0134] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) que es capaz de unirse de manera específica a y de bloquear TREM-1 de la SEQ ID NO: 1 puede contener mutaciones de tipo « parche de carga», tal como se describe en el presente documento.

20 [0135] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede tener una viscosidad disminuida en comparación con mAb 0170, pero todavía tiene una K_D para SEQ ID NO: 1 de menos de 0,5 nM.

25 [0136] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede tener una viscosidad disminuida en comparación con el mAb 0170, una K_D para SEQ ID NO: 1 de menos de 0,5 nM y una K_D para SEQ ID NO: 17 de menos de 0,6 nM, mediante la sustitución de aminoácidos no cargados de las SEQ ID NO: 2 y/o 3, implicados en las "interacciones Fab-Fab" específicas por aminoácidos con tamaño o potencial de enlace de hidrógeno alterado.

30 [0137] El anticuerpo de la presente invención (definido en las reivindicaciones) puede competir por la unión con la SEQ ID NO: 3, y comprender una LC que tiene uno o ambos residuos de glutamato (E) de las posiciones 27 y 97 de SEQ ID NO: 3 mutados a serina (S) o glutamina (Q), en el que E27 está mutado a glutamina y E97 está mutado a serina (E27Q y E97S); en el que tanto E27 como E97 están mutados a glutamina (E27Q y E97Q); o en el que E27 permanece sin mutar y E97 está mutado a S (E27, E97S), o en el que E27 permanece sin mutar y E97 está mutado a Q (E27, E97Q), o en el que E97 permanece sin mutar y E27 está mutado a P.

35 [0138] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede comprender la SEQ ID NO: 3, en la que la fenilalanina en la posición 32 (F32) está mutada a A (mAb 0322) o a S (mAb 0323).

40 [0139] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede comprender la SEQ ID NO: 2 en la que el residuo A59 se ha mutado a una tirosina, o en la que el residuo N57 se ha mutado a una serina, o en la que el residuo N57 se ha mutado a una serina y el residuo A59 se ha mutado a una tirosina.

45 [0140] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede comprender una variante de SEQ ID NO: 3 que compite por la unión con SEQ ID NO: 3, en la que tanto E27 como E97 están mutados a glutamina (318), o en la que E27 permanece sin mutar y E97 está mutado a S (E27, E97S), o en la que E27 permanece sin mutar y E97 está mutado a Q (E27, E97Q), o en la que E97 permanece sin mutar y E27 está mutado a Q.

50 [0141] El anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) puede comprender una variante de SEQ ID NO: 2 que compite por la unión con SEQ ID NO: 2, en la que el residuo A59 ha mutado a una tirosina, o en la que el residuo N57 ha mutado a serina, o en la que tanto el residuo N57 ha mutado a serina como el residuo A59 ha mutado a tirosina.

55 [0142] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.

60 [0143] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

[0144] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

65 [0145] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7.

[0146] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

[0147] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9.

5 [0148] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10.

[0149] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11.

10 [0150] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12.

[0151] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13.

15 [0152] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14.

20 [0153] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15.

[0154] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16.

25 [0155] La presente invención da a conocer un anticuerpo de la presente invención (tal como se define en las reivindicaciones) para su utilización como un medicamento, tal como se define en las reivindicaciones.

30 [0156] En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un anticuerpo de la presente invención para su utilización en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune, tal como se define en las reivindicaciones.

[0157] En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide y enfermedad intestinal inflamatoria.

35 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Radio hidrodinámico y viscosidad de variantes de mAb0170

40 [0158] Se descubrió que el radio hidrodinámico de mAb0170 del documento WO2013/120553 era superior (9-10 nm) al deseado (5-6 nm). El radio hidrodinámico se determinó mediante el análisis de dispersión de luz dinámica utilizando un conjunto de placas con 96 pocillos con un lector de placas DynaPro (Wyatt Inc.). Las placas utilizadas eran placas de ensayo Corning 3540 (Corning). El volumen de muestra total fue de aproximadamente 20 μ l y la temperatura se conservó a 25 °C para las variantes de mAb0170 (Figura 6).

45 [0159] Las mutaciones de tipo parche de carga en la CDR1 y CDR3 de la cadena ligera variable redujeron el Rh hasta el nivel esperado para mAbs monoméricos mientras que las mutaciones en la región de interacción Fab-Fab parecían aumentar el Rh. Las mutaciones en el sitio de interacción Fab-TREM-1 no afectaban al Rh.

50 [0160] Se determinó la viscosidad para las variantes 0317, 0318, 0319, 0320, 0321, 0322, 0323, 0324, 0325, 0326 y 0330 de mAb0170 mediante DLS. El radio hidrodinámico se midió en un lector de placas Wyatt DynaPro utilizando microplacas de poliestireno no tratadas negras con fondo claro Corning 3540 y microesferas de poliestireno planas de Phosphorex Inc. con un diámetro promedio de 206,5 nm (Cat. no. 106). Las muestras de proteína se transfirieron a una placa Corning 3540 y se cubrieron con un sello superior. Las muestras se centrifugaron y se midieron los radios hidrodinámicos de las muestras de proteína en el lector de placas DLS de Wyatt DynaPro. En cada pocillo se añadieron 0,5 μ l de microesferas de poliestireno y se mezclaron suavemente con pipeteo. La placa se centrifugó de nuevo y se midieron los radios hidrodinámicos de las microesferas en el lector de placas DLS de Wyatt DynaPro.

[0161] Las viscosidades de las muestras de proteínas se calcularon como

60 viscosidad (proteína) = (radio hidrodinámico (microesferas, promedio) x viscosidad (tampón))/radio hidrodinámico (microesferas, real)

65 donde la viscosidad (proteína) es la viscosidad calculada de solución de proteína, radio hidrodinámico (microesferas, medida) es el radio hidrodinámico medido de las microesferas de poliestireno en la solución de proteínas, viscosidad (tampón) es la viscosidad del tampón y el radio hidrodinámico (microesferas, real) es el diámetro promedio real de las microesferas [He et al., Anal Biochem, 399, 141-143, 2010].

[0162] La viscosidad se determinó mediante microrreología para las variantes 0332 y 0333 de mAb0170. Para el análisis reológico, se usó una jeringa Hamilton LT de 250 μ l (Hamilton-Bonaduz Inc) con una aguja Novofine 30G acoplada. La jeringa se colocó en un soporte de aluminio hecho a medida y sujeto a una plataforma. El émbolo de la jeringa fue impulsado por un analizador de textura TAXTPlus, que midió la fuerza resultante sobre el émbolo con una velocidad de inyección predeterminada. Cada muestra se probó con tres velocidades de inyección diferentes. La velocidad de la cruceta y la fuerza medida se utilizaron para calcular la velocidad de corte y la tensión de corte respectivamente. La viscosidad se puede expresar en relación con la velocidad de corte como:

$$10 \quad \eta_{\text{proteína}} = \tau w / \gamma = (\Delta P D / 4L) / ((32Q) / (\pi D^3))$$

donde $\eta_{\text{proteína}}$ es la viscosidad de la solución de proteína, γ es la velocidad de corte aparente, τw es la tensión de corte, P es la presión resultante de impulsar el émbolo, Q es el caudal volumétrico del fluido que pasa a través de la aguja capilar y D y L son el diámetro interno y la longitud, respectivamente, del capilar (Allahham y otros, 2004; Internacional J Pharm 270, 139-148). La viscosidad, $\eta_{\text{proteína}}$, se calculó a partir de los valores conocidos de D , L y Q y el valor medido de P .

[0163] El análisis mostró que tanto las mutaciones de tipo "parche de carga" como las mutaciones de "interacción Fab-Fab" redujeron la viscosidad (Figura 1). Se encontró que la variante de mAb SEQ ID NO: 5, que comprende las mutaciones de tipo parche de carga E27Q y E97Q, tenía la viscosidad más baja.

Ejemplo 2: Cinética de variantes de mAb0170

[0164] Se determinó la cinética de unión de las variantes de mAb 0170 hacia TREM-1-Fc humano y TREM-1-Fc de cynomolgus, respectivamente. Los estudios de unión se realizaron en un analizador ProteOn (BioRad) que mide las interacciones moleculares en tiempo real mediante resonancia de plasmones superficiales. Los experimentos se realizaron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 15 °C en el compartimento de muestras. La señal (UR, unidades de respuesta) indicada por ProteOn está directamente correlacionada con la masa en las superficies de los chips sensor individuales en las seis celdas de flujo paralelas. El anticuerpo monoclonal anti-Fc humano o el anticuerpo policlonal anti-Fc murino de los kits de captura de Fc humano o de ratón Biacore se inmovilizaron en dirección horizontal sobre células de flujo de un chip sensor GLM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inmovilización final del anticuerpo de captura fue de aproximadamente 2600-6000 UR en cada experimento. La captura de anticuerpos monoclonales purificados de ratón o anticuerpos anti-hTREM-1 expresados de forma recombinante se realizó diluyendo los anticuerpos a 5-10 nM en tampón de desarrollo (Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, tensioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4), seguido de una inyección en dirección vertical a 30 μ l/min durante 60 segundos, creando puntos intermedios de referencia adyacentes a todas las celdas de flujo con solo el anticuerpo anti-Fc inmovilizado. Esto habitualmente dio como resultado niveles de captura finales de anticuerpos de prueba de aproximadamente 100 a 300 UR y valores de Rmax del analito de 30 a 90 UR. La unión de las proteínas hTREM-1 o cTREM-1 se realizó inyectando analito (antígeno) sobre todas las células de flujo en dirección horizontal para permitir análisis comparativos de la unión a diferentes anticuerpos anti-TREM-1 capturados en relación con la unión al punto intermedio de referencia. Las proteínas hTREM-1 o cTREM-1 se diluyeron en serie 1:3 a 1,2-100 nM o en tampón de desarrollo, se inyectaron a 100 μ l/min durante 250 s y se dejaron disociar durante 600 s. La superficie GLM se regeneró después de cada ciclo de inyección de analito mediante dos inyecciones de 18 s de glicina 10 mM, pH 1,7 y NaOH 50 mM a 100 μ l/min. Esta etapa de regeneración eliminó el anticuerpo anti-TREM-1 y cualquier proteína TREM-1 unida de la superficie del anticuerpo de captura inmovilizado y permitió la unión posterior del siguiente par de muestras de interacción. El procedimiento de regeneración no eliminó el anticuerpo de captura anti-Fc directamente inmovilizado de la superficie del chip.

[0165] La afinidad de unión entre los anticuerpos y el antígeno se cuantificó mediante la determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_D) determinada mediante la medición de la cinética de formación y disociación de complejos. Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente, tal como k_a (velocidad de asociación) y k_d (velocidad de disociación) se recuperaron ajustando los datos al modelo de Langmuir 1:1 utilizando el software de evaluación ProteOn para el análisis de datos. K_D está relacionado con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d/k_a$.

[0166] Las curvas de unión se procesaron mediante doble referencia (resta de señales de superficie de referencia así como inyecciones de tampón en blanco sobre anticuerpos anti-TREM-1 capturados) antes del análisis de datos. Esto permitió la corrección del ruido del instrumento, el cambio de volumen y la deriva durante las inyecciones de muestras.

[0167] Se encontró que todas las variantes de mAb 0170 tenían una afinidad similar hacia TREM-1-Fc humano como mAb 0170. De manera interesante, las variantes de mAb que comprenden una mutación de "interacción Fab-TREM-1", tal como mAb 0322, tenían una mayor afinidad hacia cynomolgus TREM-1-Fc (Tabla 2).

Ejemplo 3: La cinética y la viscosidad de mAb 0330 y mAb 0333

[0168] En un intento por generar un mAb con afinidad mejorada con afinidad mejorada hacia TREM-1 de cynomolgus y que tenga baja viscosidad, las mutaciones de SEQ ID NO 9 se combinaron con las mutaciones en SEQ ID NO 5, que se encontró que tenía la viscosidad más baja entre las variantes de mAb0170 y con SEQ ID NO: 11, que se encontró que tenía un efecto modesto sobre la viscosidad. La afinidad aumentada hacia TREM-1-Fc de cynomolgus se mantuvo para la variante de mAb que comprendía las mutaciones combinadas (mAb 0330 y mAb 0333) y las mutaciones no afectaron la afinidad hacia TREM-1-Fc humano. La viscosidad de mAb0330 y mAb 0333 se redujo notablemente en comparación con mAb 0170 del documento WO2013/120553 (Figura 1).

Ejemplo 4: Cultivo de una línea celular estable BWZ'36/hTREM-1

[0169] Se cultivaron células informadoras BWZ/hTREM-1 en RPMI 1640 sin rojo fenol (n.º de cat. 11835, Gibco, Carlsbad CA, EE. UU.), suplementado con FCS al 10 % (n.º de cat. 16140-071, Gibco, Nueva York, EE. UU.), 1% Pen/Strep (Cat# 15070-06, Gibco), piruvato de sodio 1 mM (n.º de cat 11360, Gibco), 5 μ M -2ME (n.º de cat 31350-010, Gibco) y L-Glutamina 2 mM (n.º de cat 25030, Gibco). No se requirieron placas ni recubrimientos especiales. Se agregaron 10 ml de Versene (n.º de cat 15040, Gibco) para separar las células que, a continuación, se transfirieron a tubos, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron en RPMI 1640 fresco sin rojo de fenol. A continuación, estas células estaban listas para usar en un ensayo o para volverse a cultivar para su posterior propagación.

Ejemplo 5: Caracterización funcional de las variantes mAb 0170

[0170] La capacidad de las variantes de mAb 0170 anti-TREM-1 para inhibir la señalización de TREM-1 humana se determinó usando una línea celular informadora (BWZ'36/hTREM-1) proporcionada por Bioxell. La línea celular informadora se estimuló con PGN y el ligando PGLYRP1 de TREM-1, ya sea como proteína recombinante o expresada mediante neutrófilos activados antes de la incubación con mAb. Se descubrió que la potencia de las variantes para inhibir la señalización de TREM-1 era clínicamente relevante y estaba a la par con la del mAb 0170 del documento WO2013/120553 (Figuras 2A y B).

[0171] Asimismo, se determinó la capacidad de inhibir la señalización de TREM-1 de cynomolgus para las tres variantes de mAb0170 con la viscosidad más baja y se observó que dos variantes tenían mayor afinidad hacia TREM-1 de cynomolgus. En este ensayo que utilizó una línea celular informadora establecida TE 426.27, se observaron potencias similares de las variantes de mAb y mAb0170 del documento WO2013/120553 (figura 3).

[0172] Además, se evaluó la potencia de las variantes de mAb para bloquear la liberación de TNFa de células primarias de donantes sanos. En este ensayo, los monocitos se diferenciaron en macrófagos M2 en condiciones hipóxicas para aumentar la expresión de TREM-1 y se activaron con PGN y PGLYRP1 recombinante antes de la incubación con mAb. Se encontró que las variantes de mAb eran tan potentes como 0170 para inhibir la liberación de TNFa mediada por TREM-1 de macrófagos M2 hipóxicos (Figura 4).

Ejemplo 6 Estructura cristalina de un complejo Fab 0170-Fab 0170

[0173] Se evaluó el potencial de las moléculas de mAb 0170 para interactuar mediante autointeracciones específicas mediante análisis cristalográfico de una estructura cristalina de Fab 0170-Fab 0170. *Materiales:* La región Fab de mAb 0170 (SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19) en un tampón que consistía en fosfato 10 mM, KCl 2,68 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 a una concentración de proteína de 8,5 mg/ml.

[0174] *Procedimientos:* La región Fab de mAb 0170 se cristalizó en un experimento de difusión de vapor de gota colgante mediante el equilibrio de una gotita que consistía en 2 μ l de solución de proteína mezclada con 2 μ l de solución de reserva frente a una reserva de 0,5 ml compuesta de 20 % (p/v) de PEG 8000, K₂HPO₄ 200 mM. El cristal se transfirió a una gota que consistía en 2 μ l de 35 % (p/v) de PEG3350, K₂HPO₄ 200 mM y se montó en un "litholopp" con un diámetro de 0,2 mm (Molecular Dimensions Limited) y se enfrió rápidamente en nitrógeno líquido.

[0175] Se recogieron los datos de difracción con rayos X mediante MAXLAB 911-2, Lund University, Suecia, utilizando un chorro criogénico que funcionaba a 100 K. Las imágenes de datos sin procesar se indexaron, se integraron y se sometieron a escala utilizando el paquete de programas XDS (Kabsch, Acta Crystallogr. D66, 133-144 (2010)). El grupo espacial del cristal fue P2(1)2(1)2(1), con parámetros de celda unitaria, $a = 62,4 \text{ \AA}$, $b = 110,9 \text{ \AA}$, $c = 158,4 \text{ \AA}$. Los datos se recogieron con una resolución de 2,40 \AA . La estructura se resolvió mediante sustitución de molecular utilizando el software Phenix (Adams et al., Acta Crystallogr. D66, 213-221 (2010)) tal como se implementa en el conjunto de programas CCP4i (Potterton et al., Acta Crystallogr. D59, 1131-1137 (2003)). Los modelos de búsqueda eran las estructuras de la cadena pesada de la entrada de pdb 1AD0.pdb (85% de identidad) y de la cadena ligera de la entrada de pdb 2QRG (94% de identidad). Se llevó a cabo el refinamiento de la estructura utilizando Refmac5 (Murshudov et al., Acta Crystallogr. D53, 240-255 (1997)) del conjunto de programas CCP4i. Se utilizó la versión 7 de Coot (Emsley et al., Acta Crystallogr. D66, 486-501 (2010)) para la reconstrucción y validación manual de la estructura.

Resultados y discusión

[0176] La estructura cristalina de la región Fab de mAb 170 contenía cuatro moléculas Fab en la unidad asimétrica (las cadenas pesadas se marcaron con A y C, las cadenas ligeras se marcaron con B y D). Las moléculas Fab se empaquetaron como dímeros con la región de unión al antígeno de una molécula Fab interactuando con la región de unión al antígeno de otra molécula Fab. No fue posible incluir y refinar la última cisteína de SEQ ID NO: 19 en la estructura cristalina aunque se esperaría que estuviera en enlace disulfuro con una Cys de SEQ ID NO: 18 de la cadena pesada. Hubo algunas señales de exceso de densidad electrónica de 2Fo-Fc y Fo-Fc en el área, y es posible que el enlace disulfuro esté presente en un subconjunto de las moléculas Fab. No hubo densidad de electrones 2Fo-Fc ponderada sigmaA significativa para los residuos G26, K78-N79, I104-R105 y S138-E141 de SEQ ID NO: 18 en la cadena A en la unidad asimétrica y para E1, G26-F 27, M102-R105, S136-E141, S195-K200 de SEQ ID NO: 18 en la cadena C en la otra molécula Fab en la unidad asimétrica. También faltaba una densidad de electrones 2Fo-Fc ponderada en sigmaA significativa para los residuos D30-Y34 de SEQ ID NO: 19 en la cadena D. Estos residuos no se incluyeron en la estructura cristalina pero se incluyeron en el análisis de interacción molecular de la interfaz Fab-Fab mediante superposición con la estructura cristalina del fragmento mAb 0170 de la estructura cristalina de mAb 0170 anti-TREM-1 humanizado del documento WO2013/120553.

[0177] Los parámetros de calidad de la estructura del fragmento Fab de mAb 0170 mostraron un factor R general de la estructura = 24 % y el factor R libre = 30 %. El coeficiente de correlación general fue 0,93 y el índice de precisión del componente de difracción, DPI = 0,3 Å (Cruickshank, *Acta Crystallogr. D55*, 583-601 (1999)). La desviación cuadrática media de las longitudes de enlace en la estructura respecto de las longitudes de enlace ideales = 0,025 Å y la desviación cuadrática media de los ángulos de enlace ideales = 2,326° (Engh y Huber, *Acta Crystallogr. A47*, 392-400 (1991)).

[0178] Se llevó a cabo un análisis de distancias moleculares utilizando el programa NCONT del conjunto de programas CCP4 (Potterton et al., *Acta Crystallogr. D59*, 1131-1137 (2003)) con un corte de 4 Å para distancias intermoleculares (Tabla 4). El análisis mostró que los residuos de aminoácidos N57 y A59 de SEQ ID NO: 2 pertenecían al grupo de aminoácidos implicados en las interacciones Fab-Fab en la estructura cristalina.

Tabla 4. Interacciones Fab-Fab pronosticadas basadas en la superposición de la estructura cristalina de mAb 0170 anti-TREM-1 humanizado descrita en el documento WO2013/120553 con la presente estructura cristalina de la región Fab de mAb 017 observada.

Fuente de aminoácidos, Fab 1 (Cadena A y B)	Aminoácidos diana, Fab 2 (Cadena C y D)
F32	SEQ ID NO: 3
F32	SEQ ID NO: 3
D33	SEQ ID NO: 3
Y34	SEQ ID NO: 3
Y34	SEQ ID NO: 3
D98	SEQ ID NO: 3
R52	SEQ ID NO: 2
R52	SEQ ID NO: 2
S55	SEQ ID NO: 2
S55	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
A59	SEQ ID NO: 2
I104	SEQ ID NO: 2
I104	SEQ ID NO: 2
R106	SEQ ID NO: 2
	F32

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que es capaz de unirse a y bloquear TREM-1, que comprende:

- (i) una cadena pesada, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 4;
 - (ii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5;
 - (iii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6;
 - (iv) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 7;
 - (v) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 8;
 - (vi) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9;
 - (vii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 10;
 - (viii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14;
 - (ix) una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (x) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (xi) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (xii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 5; o
 - (xiii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14;
- 30 en el que la cadena pesada comprende una región constante de IgG4.

2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y en el que la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 5.

35 3. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 4. Célula procariota o eucariota que expresa de forma recombinante el anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

45 5. Procedimiento para producir un anticuerpo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende expresar de manera recombinante el anticuerpo en una célula procariota o eucariota.

50 6. Anticuerpo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 3, para su uso como medicamento en un sujeto que lo necesita.

55 7. Anticuerpo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune en un sujeto que lo necesita.

8. Anticuerpo o composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 7, en el que la enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en:

enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, diabetes tipo I, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmune, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjögren, nefritis autoinmune, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunes que son el resultado de una inflamación aguda o crónica

60 9. Anticuerpo o composición farmacéutica para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

65 10. Anticuerpo o composición farmacéutica para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra profilácticamente.

11. Anticuerpo o composición farmacéutica para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el sujeto es un ser humano.

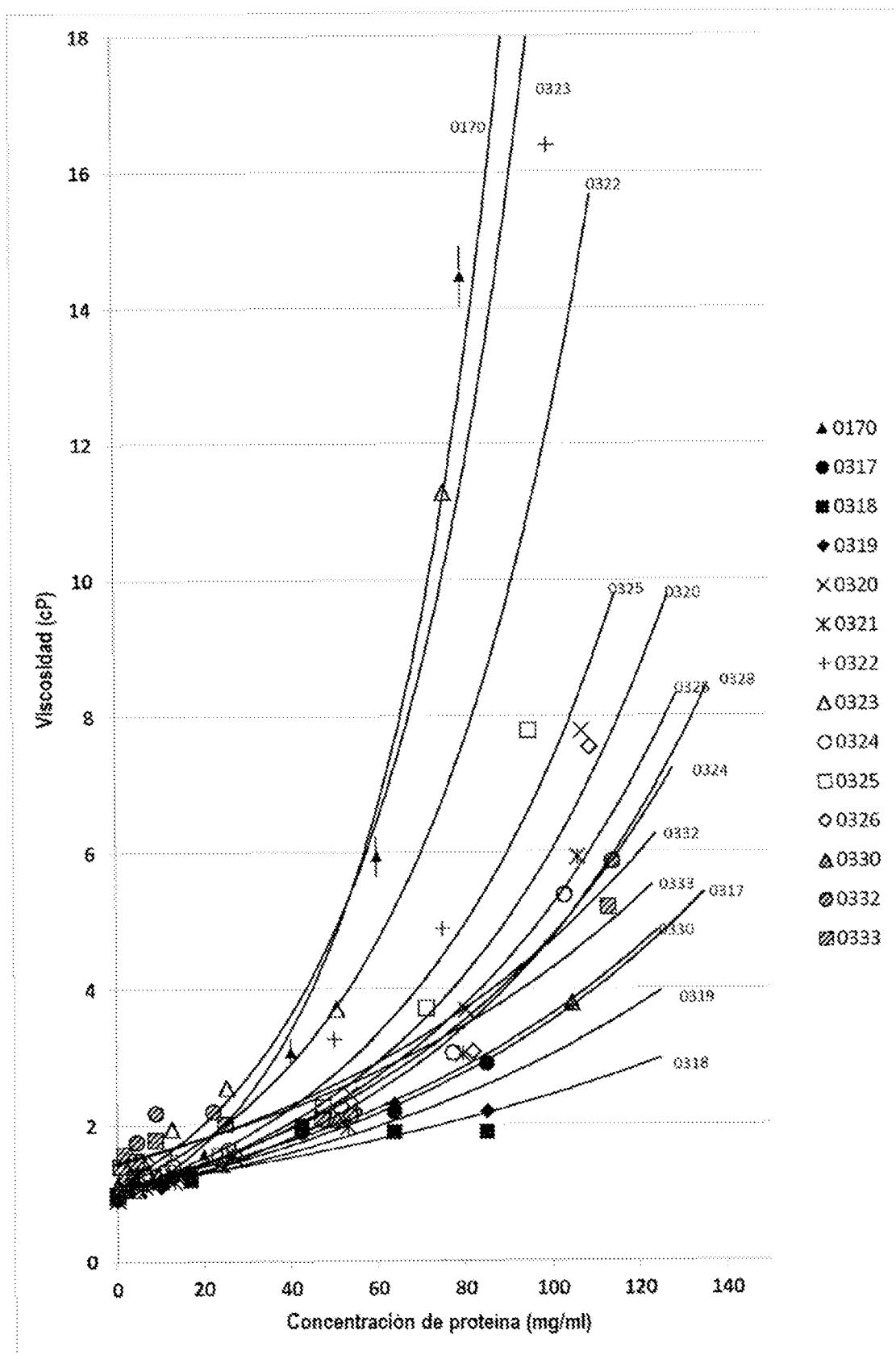


Figura 1

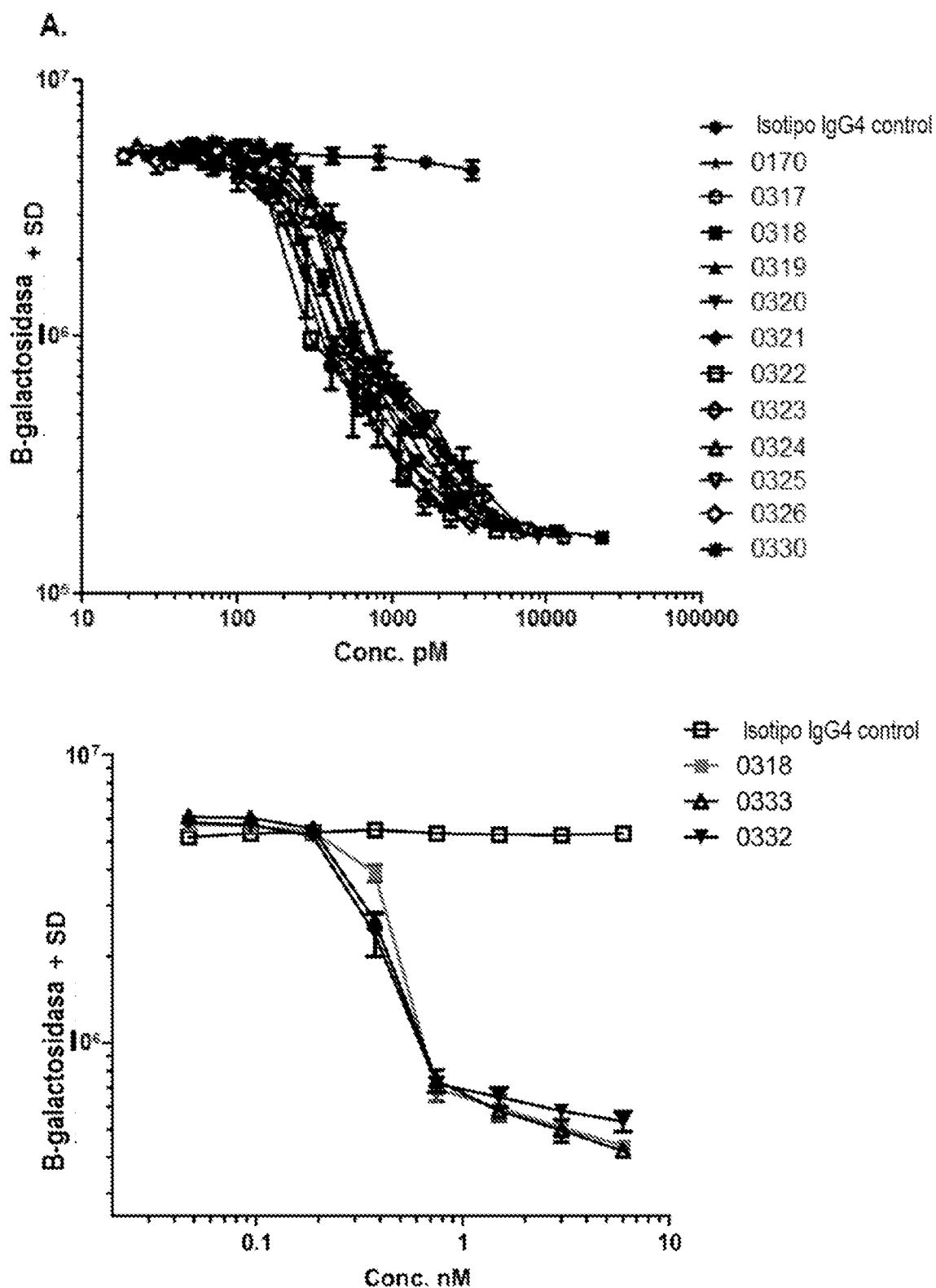


Figura 2

ID mAb	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

Figura 2A

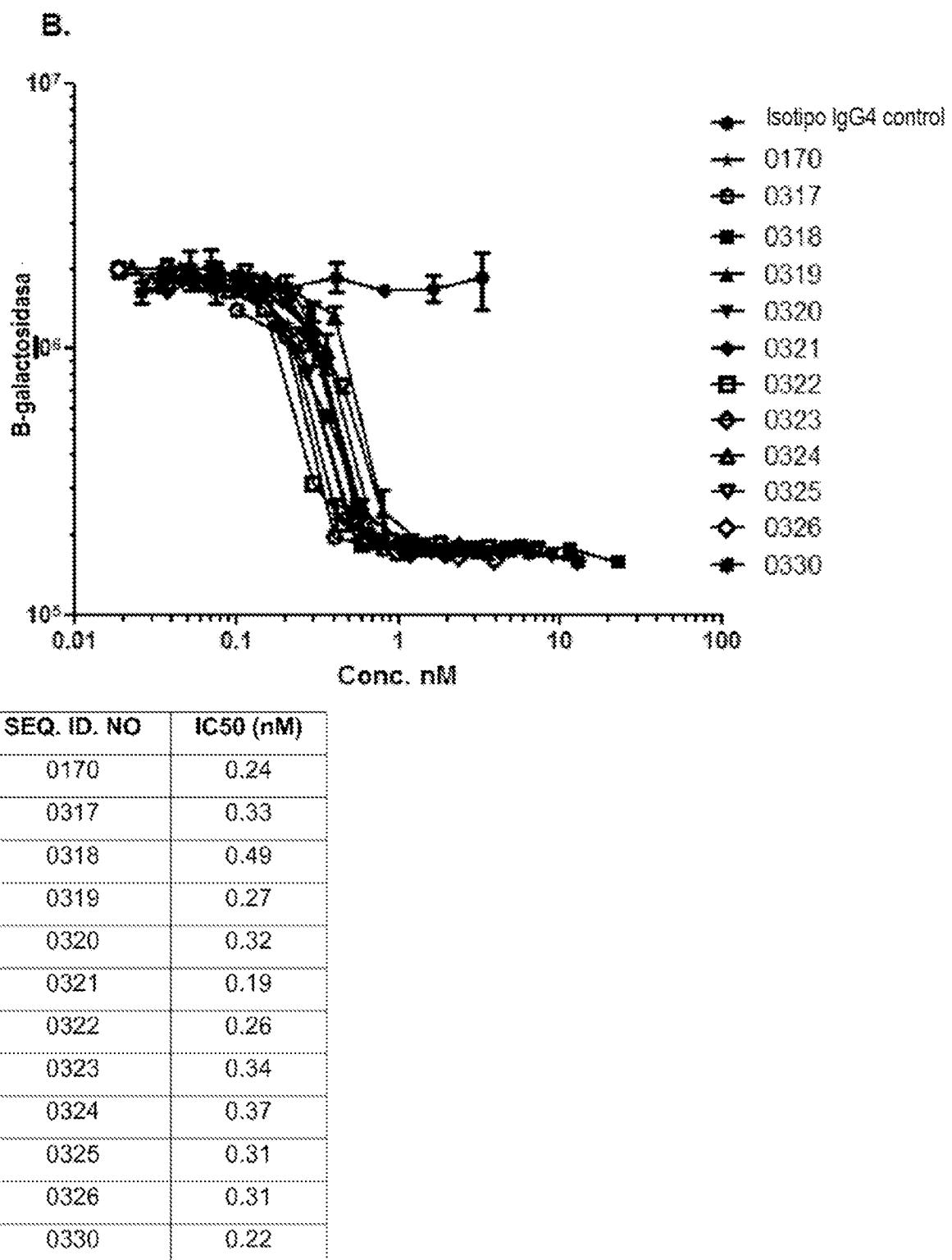
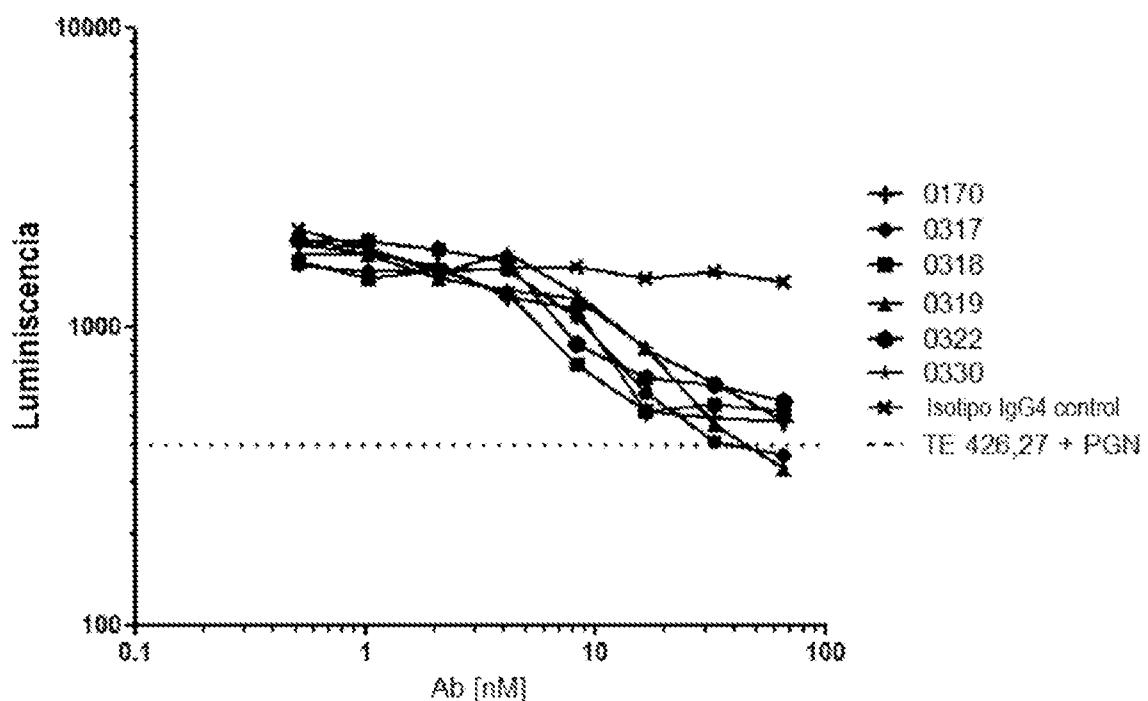


Figura 2B



SEQ. ID. NO	IC50 (nM)
0170	6.0
0317	9.5
0318	5.6
0319	17.7
0322	5.9
0330	10.7

Figura 3

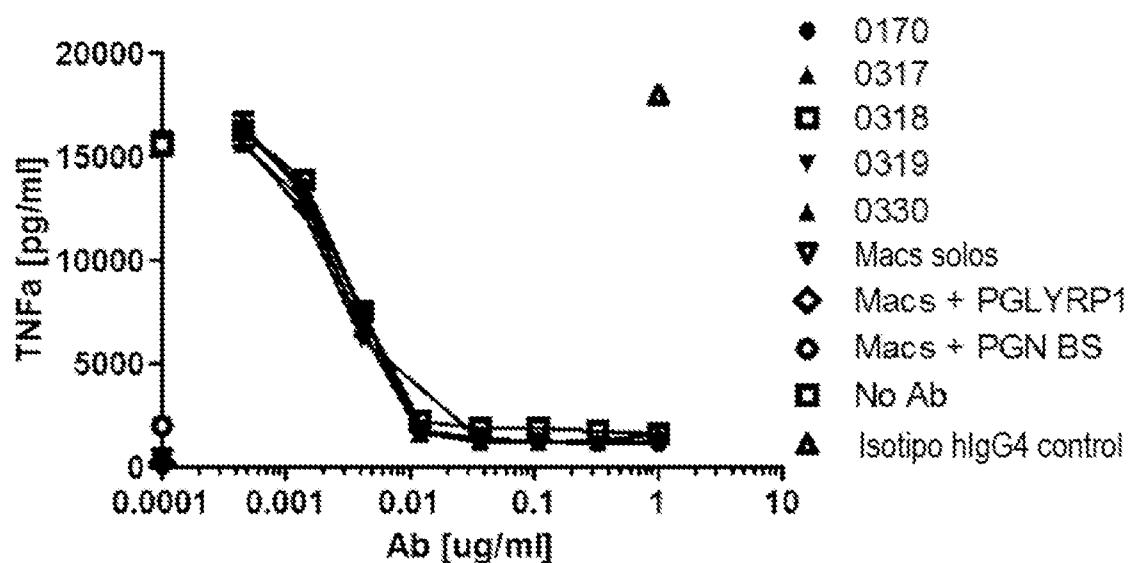


Figura 4

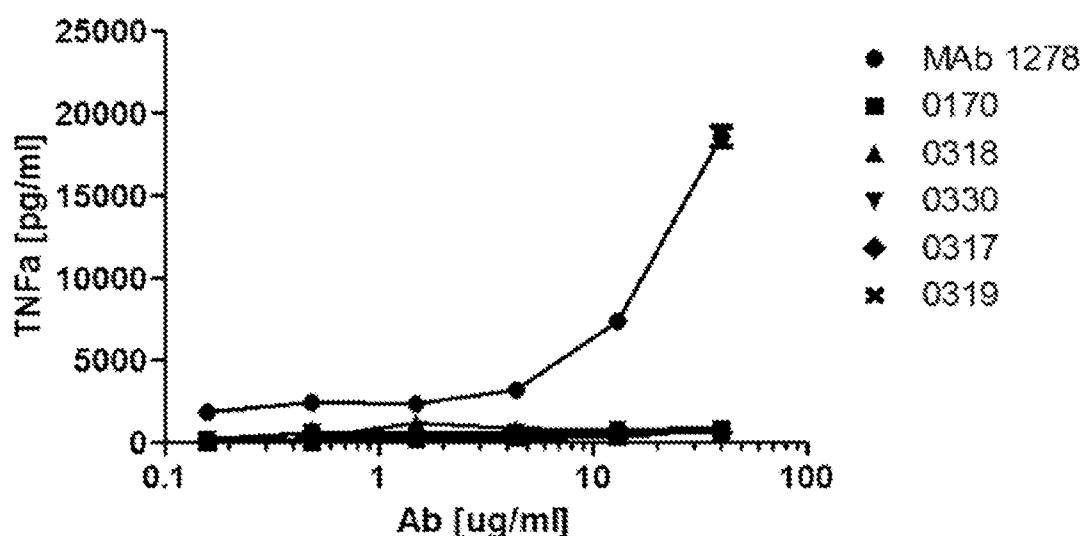


Figura 5

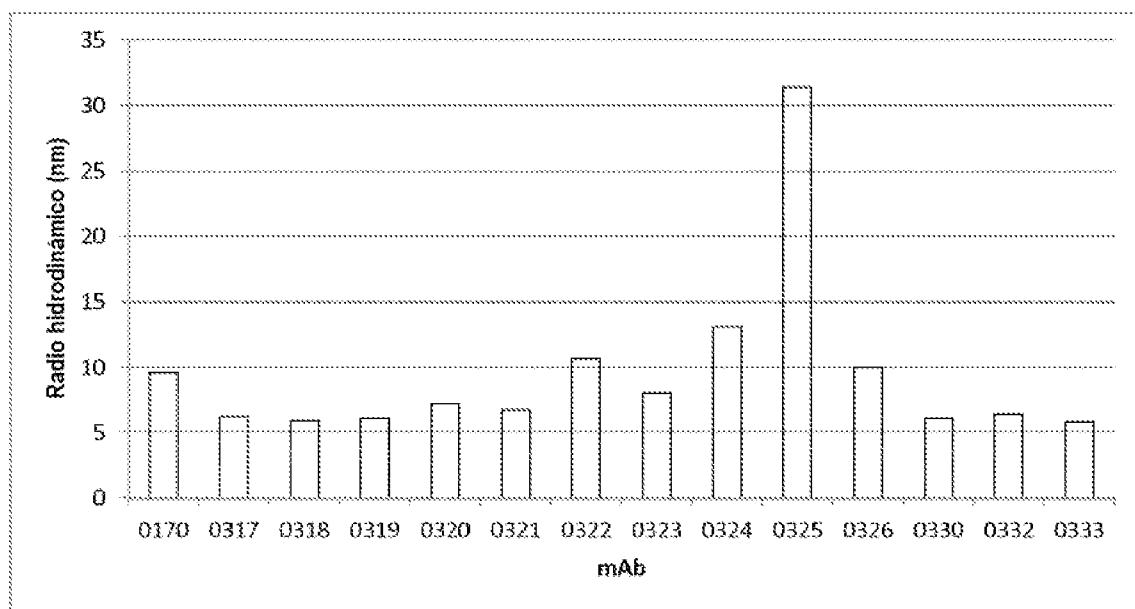


Figura 6