

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 268**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/EP2012/074092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12794962 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2814844**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a y bloquean un receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 (TREM-1)**

30 Prioridad:

**15.02.2012 EP 12155641
15.02.2012 US 201261598968 P
16.02.2012 US 201261599447 P
12.03.2012 EP 12158974
18.07.2012 EP 12176892
18.07.2012 US 201261672799 P
23.07.2012 US 201261674434 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STENNICKE, VIBEKE WESTPHAL;
READ, CHRISTINE BRENDER;
GRELL, SUSANNE NEDERGAARD;
WIBERG, CHARLOTTE;
SALBO, RUNE;
HENRIKSEN, ANETTE y
PADKJÆR, SØREN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 268 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

Anticuerpos que se unen a y bloquean un receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 (TREM-1)

- 5 La presente divulgación se refiere a un método para identificar un anticuerpo de TREM-1 funcional. La invención se refiere a anticuerpos, como se define en las reivindicaciones, que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 y que son capaces de reducir o bloquear la actividad de TREM-1 (señalización y/o activación). Además, la invención se refiere a usos para dichos anticuerpos, tales como usos terapéuticos y farmacéuticos.
- 10 El receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 (TREM-1) es un receptor que se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Cuando se activa, TREM-1 se asocia con una proteína de señalización, DAP12, y desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias de las células que lo expresan (Bouchon *et al.*, J. Immunol., 2000: 164 (10): 4991-4995). Se sabe que la expresión de ARNm y proteína de TREM-1 está regulada positivamente en las células mieloides de individuos con septicemia, artritis reumatoide (AR) y enfermedad inflamatoria del intestino (EI). Cada vez más pruebas científicas apoyan la teoría de que TREM-1 contribuye al desarrollo y la progresión de enfermedades inflamatorias, ya que los monocitos y neutrófilos TREM-1 positivos que se reclutan a una área inflamada agravan la inflamación (Bouchon *et al.* Nature 2001; 410: 1103-1107; Schenk *et al.*, Clin Invest. 2007; 117(10): 3097-3106; Kuai *et al.*, Rheumatology (Oxford). 2009; 48(11):1352-1358.
- 15 Se conocen anticuerpos que son capaces de unirse a TREM-1, incluyendo los disponibles en el mercado TREM26 y TREM37 (cat. n.º 314902 y 316102, respectivamente, Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.), MAB1278 (cat. n.º MAB1278, R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU.), mAb 6B1 (cat. n.º HM2252, Hycult Biotech, Uden, Países Bajos) y 2E2 anti TREM-1 (cat. n.º HPA005563, Sigma-Aldrich, Dinamarca). Todos los anticuerpos de TREM-1 conocidos son agonistas cuando se inmovilizan; es decir, aumentan la liberación de citocinas de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Otra característica de los anticuerpos de TREM-1 conocidos es que no reaccionan de forma cruzada con TREM-1 de primates, tales como monos cynomolgus o monos rhesus, lo que significa que los anticuerpos conocidos no pueden ensayarse en estos animales.
- 20 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo que sea capaz de unirse a y bloquear la función de TREM-1. Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo de TREM-1 que sea capaz de evitar que TREM-1 forme dímeros/multímeros. Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo de TREM-1 que sea capaz de bloquear la activación y señalización de TREM-1. Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo de TREM-1 que sea capaz de interferir con la interacción entre TREM-1 y su ligando. Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo de TREM-1 que sea capaz de bloquear la liberación de citocina de una célula mioide. Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo de TREM-1 que tenga poca o ninguna actividad agonista cuando sea soluble o esté inmovilizado. Existe también la necesidad en la técnica de un anticuerpo que sea capaz de unirse tanto a TREM-1 humano como a TREM-1 de una o más de otras especies, tales como un primate, para permitir la investigación toxicológica así como evaluar la farmacocinética y farmacodinámica del anticuerpo en modelos animales adecuados.
- 25 Se desvelan en el presente documento anticuerpos de TREM-1 que son adecuados para su uso como productos farmacéuticos. Dichos anticuerpos pueden tener una influencia sustancial en la calidad de vida de individuos con septicemia o una enfermedad inflamatoria crónica tal como artritis reumatoide, artritis psoriásica y enfermedad inflamatoria del intestino.
- 30 Arts, Rob J W, *et al.*, European Cytokine Network, Vol. 22 (1), 1 de marzo de 2011, páginas 11-14, describe la interacción de TREM_1 con el complejo de LPS/receptor TLR4. El documento WO 2008/088849 describe el tratamiento, la detección y el control de la inflamación mediante TREM-1. El documento US 2003/165875 describe el receptor TREM (receptor desencadenante expresado en células mieloides) y usos del mismo. R&D Systems (<http://www.rndsystems.com/Products/MAB>) 26 de octubre de 2010, página 1, desvela un "anticuerpo de TREM-1 humano". Eleanor Molloy, Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, Vol. 4(1), 1 de enero de 2009, páginas 51-56, describe la familia del receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM) y la aplicación de sus antagonistas.
- 35
- 40
- 45
- 50

Sumario

- 55 La presente divulgación se refiere a un método para identificar un anticuerpo de TREM-1 funcional, que comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incubaba con un agente modificador de TREM-1; (c) poner en contacto el cocultivo de (b) con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor o mayor que la actividad medida en (b).
- 60

- El método puede adaptarse para identificar una molécula de bloqueo de TREM-1, tal como un anticuerpo. El método para identificar un anticuerpo de bloqueo de TREM-1 comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incubaba con un compuesto activador, tal como un ligando de TREM-1 o un neutrófilo activado; (c) poner en contacto el cocultivo de la primera célula y el compuesto activador, tal como un ligando de TREM-1, o un
- 65

neutrófilo activado con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor que la actividad medida en (b).

El método puede adaptarse para identificar un anticuerpo estimulante de TREM-1. El método para identificar un anticuerpo estimulante de TREM-1 comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula; (c) poner en contacto/incubar dicha célula con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula es mayor que la actividad de la medida en (b).

La primera célula puede ser de origen hematopoyético. El agente modificador de (b) puede ser un neutrófilo activado o un ligando de TREM-1. La proteína de señalización puede ser DAP10, DAP12, TCR zeta, Fc gamma RIII y un receptor de Fc, o una parte del mismo. La proteína de señalización puede señalizar mediante un factor de transcripción tal como NFAT o NFkB. El gen indicador puede ser un gen que no se exprese de forma nativa en dicha primera célula y puede ser un gen que codifique β -galactosidasa, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP) o cloranfenicol transferasa. La presente divulgación también proporciona anticuerpos estimulantes de TREM-1 que pueden identificarse por medio del método de la invención.

La presente invención se refiere a anticuerpos como se definen en las reivindicaciones que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 y que son capaces de bloquear la función de TREM-1. Dichos anticuerpos pueden ser capaces de prevenir o reducir la dimerización o multimerización de TREM-1. Dichos anticuerpos pueden ser capaces de bloquear la interacción entre TREM-1 y su ligando, o los anticuerpos pueden ser capaces de bloquear la función de TREM-1 que está inducida por un ligando de TREM-1. El TREM-1 puede ser TREM-1 humano y/o TREM-1 de una especie distinta del ser humano, tal como TREM-1 de otro primate distinto del ser humano.

Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de competir con mAb 0170 por la unión a TREM-1 humano como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos D38 a F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano). Los anticuerpos de la invención tienen un epítipo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 y L45 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano) y uno, dos o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en E46, K47 y F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como puede determinarse usando HX-MS. Los anticuerpos de la invención pueden tener un epítipo que comprende uno, dos, tres o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los D42, E46, D92 y H93 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como puede determinarse midiendo la unión de anticuerpo a variantes de TREM-1.

Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de competir con mAb 0170 por la unión a TREM-1 de mono cynomolgus como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos E19 a L26 del TREM-1 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 12), o los aminoácidos correspondientes de SEQ ID NO: 21, como puede determinarse usando HX-MS.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse como productos farmacéuticos para el tratamiento de individuos con una o más enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación crónica. Por lo tanto, la presente invención también proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones para su uso como un medicamento, tal como para su uso en el tratamiento de individuos con una o más enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación crónica.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: activación de la línea celular BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ (también denominada en el presente documento "célula indicadora BWZ/hTREM-1") se reduce por anticuerpos tales como 14F128 y 14F113 pero no por los anticuerpos disponibles en el mercado MAB1278 (R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU.: cat. n.º MAB1278), anti-TREM-1 HPA (Sigma, EE.UU.: cat. n.º HPA005563), aTREM26 (Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.: cat. n.º 314902) y aTREM37 (Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.: cat. n.º 316102).

Figura 2: La célula indicadora BWZ/hTREM-1 sola o cocultivada con neutrófilos preestimulados por TLRL. Los neutrófilos activados por TLRL son capaces de inducir un aumento 15 veces de la señal (luminiscencia) en comparación con neutrófilos no activados (véase las dos últimas columnas). El control positivo (el MAB1278 agonista, unido a placa, R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU., cat. n.º MAB1278) proporcionó una inducción de 32 veces en este experimento (véase segunda columna). Los datos se representan como medias $\pm$ ETM (n = 3).

Figura 3: un ensayo indicador normalizado, en el que TREM-1 está estimulado por neutrófilos activados por PGN, muestra que los anticuerpos disponibles en el mercado TREM-26 (cat. n.º 314902, Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.), TREM-37 (cat. n.º 316102, Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.), MAB1278 (cat. n.º MAB1278, R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU.) y HPA anti TREM-1 (cat. n.º HPA005563, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) son anticuerpos agonistas que potencian la señal luminescente dependiente de TREM-1 en el ensayo indicador (proporcionando una señal mayor de 1). Se muestra que el anticuerpo identificado como

5F27A1 y 14F69 es el mejor bloqueador (proporcionando una señal menor de 0,5). Los datos se representan como media $\pm$ ETM ($n = 3$). MAB002 de control de isotipo (cat. n.º MAB002, R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU.). Todos los anticuerpos se han usado a 1 μ g/ml.

Figura 4: actividad en el ensayo indicador de BWZ/hTREM-1. En el eje x, se muestra la actividad de bloqueo de TREM-1 como la actividad que permaneció cuando se añadió anticuerpo 0,2 μ g/ml a la célula indicadora BWZ/hTREM-1, que se había preactivado con neutrófilos estimulados por PGN. Cuando los anticuerpos de TREM-1 estuvieron unidos a placa, algunos (incluyendo todos los anticuerpos de TREM-1 disponibles en el mercado) fueron capaces de unirse de forma cruzada a TREM-1 y de este modo activar TREM-1. Esta actividad se muestra en el eje y. Por lo tanto, los anticuerpos mostrados como puntos en la caja en la esquina inferior izquierda muestran todas propiedades diferentes en comparación con anticuerpos conocidos, que son provechosamente de bloqueo y no agonistas.

Figura 5: unión de anticuerpos de TREM-1 humano a PBMC de un mono rhesus. En la esquina superior izquierda, se muestra que la mayoría de los anticuerpos solamente se unían con TREM-1 humano (cada punto negro representa un anticuerpo). Algunos anticuerpos, tales como mAb 0025 y 14F128, 14F11, 14F29, 14F113 y 14F69 fueron capaces de unirse tanto a TREM-1 humano como a TREM-1 de mono rhesus, mostrando reactividad cruzada.

Figura 6: unión de anticuerpos anti TREM-1 humano a PBMC de un mono cynomolgus. En la esquina superior izquierda, se muestra que la mayoría de los anticuerpos se unían solamente con TREM-1 humano (cada punto negro representa un anticuerpo). Algunos anticuerpos, tales como mAb 0025 y 14F128, 14F11, 14F29, fueron capaces de unirse a TREM-1 tanto humano como de mono cynomolgus, mostrando reactividad cruzada. Algunos anticuerpos, tales como 14F69 (mAb 0044), son capaces de unirse a PBMC de mono cynomolgus (Figura 6B) y PBMC humanas (Figura 6C) igualmente bien.

Figura 7: cobertura de secuencia de péptidos analizados por HX de hTREM-1 en presencia y ausencia de mAb 0023 o mAb 0026 (A), mAb 0024 o Clon 26 Biolegend Clon 26 (B), mAb 0025 (C) o RnD Biosystems' MAB1278 (D). La secuencia primaria se presenta sobre los péptidos analizados por HX (mostrados como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de mAb se presentan en blanco, mientras que los péptidos que muestran incorporación de deuterio reducida tras unión a mAb están coloreados en negro. Las regiones de secuencia encuadradas definen el epítipo.

Figura 8: mapeo estructural del epítipo de mAb 0025 en hTREM-1. La estructura de hTREM-1 (pdb 1Q8M) se representa con una parte del dímero como alambre C alfa negro. La otra parte del dímero de hTREM-1 se muestra en lazo gris con el epítipo 0025 presentado en negro.

Figura 9: la célula indicadora BWZ/hTREM-1 cocultivada con complejo de ligando de TREM-1 refleja la funcionalidad de TREM-1 que se inhibió de forma dependiente de la dosis por mAb de TREM-1 0170.

Figura 10: liberación de TNFalfa de macrófagos M2 estimulados por PGLYRP-1 se bloqueó por anticuerpos de TREM-1.

Figura 11: se alinean las secuencias de TREM-1 humano y de mono cynomolgus. Los restos de aminoácidos que difieren entre los dos se muestran en negrita. Los restos que se ha mostrado que están dentro del epítipo (como se determina usando HX-MS y resonancia de plasmón superficial) están destacados.

Breve descripción de las secuencias

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

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable del anticuerpo m14F69.

SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable del anticuerpo m14F69.

SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un primer anticuerpo humanizado de TREM-1 (mAb 0170).

SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un primer anticuerpo humanizado de TREM-1 (mAb 0170).

SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un segundo anticuerpo humanizado de TREM-1 (mAb 0122).

SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un segundo anticuerpo humanizado de TREM-1 (mAb 0122).

SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo m14F128.

SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo m14F128.

SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo m14F113.

SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo m14F113.

SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TREM-1 de mono cynomolgus (c) de tipo silvestre (wt), cuando se expresa en *E. coli*.

SEQ ID NO: 13 representa la secuencia de aminoácidos de K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6 (construcción 0222).

SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos de A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6 (construcción 0244).

SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de aminoácidos de A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6 (construcción 0245).

SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de ácido nucleico de un cebador.

SEQ ID NO: 17 representa la secuencia de ácido nucleico de un cebador.

SEQ ID NO: 18 representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 (1-134)-His6 humano (h).
 SEQ ID NO: 19 representa la secuencia de aminoácidos de cTREM-1-Cmyc2-His6 (construcción 0238).
 SEQ ID NO: 20 representa la secuencia de aminoácidos de hTREM-1-Cmyc2-His6 (construcción 0247).
 SEQ ID NO: 21 representa la secuencia de aminoácidos de cTREM-1 de longitud completa.
 5 SEQ ID NO: 22 representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 murino (m) de longitud completa.
 SEQ ID NO: 23 representa la secuencia de aminoácidos de hPGLYRP1 de longitud completa.

Descripción

10 TREM-1 es una proteína transmembrana que consiste en 234 aminoácidos, incluyendo un único dominio de inmunoglobulina extracelular y una cola citoplasmática corta sin ningún motivo de señalización aparente. Cuando está activado, TREM-1 se asocia con la proteína adaptadora de señalización que contiene ITAM, DAP12. La señalización corriente abajo puede incluir activación del factor de transcripción de NFAT, que provoca una regulación positiva de la producción de citocina proinflamatoria.

15 La presente invención se refiere a anticuerpos como se definen en las reivindicaciones que son capaces de unirse específicamente a y bloquear la función de TREM-1. Los anticuerpos de la invención pueden bloquear la función de TREM-1 reduciendo/bloqueando la activación y señalización corriente abajo de TREM-1.

20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden bloquear TREM-1 por medio de uno o una combinación de varios mecanismos diferentes, bloqueando TREM-1 directa o indirectamente. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden evitar que el ligando natural de TREM-1, la proteína de reconocimiento de peptidoglucano 1 (PGLYRP1), cree un complejo funcional con TREM-1 y/o anticuerpos de la invención pueden bloquear TREM-1 evitando que las moléculas de TREM individuales formen dímeros o multímeros. La dimerización o multimerización
 25 de TREM-1 puede reducirse o evitarse por anticuerpos de TREM-1 que sean capaces de unirse a una parte de TREM-1 que de otro modo residiría en la interfaz de un dímero de TREM-1, evitando de este modo que las moléculas de TREM-1 individuales se asocien entre sí. La dimerización o multimerización de TREM-1 puede reducirse o evitarse por anticuerpos de TREM-1 que interfieren con la interacción de TREM-1 con su ligando. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención bloquean la activación inducida por PGLYRP1 de TREM-1.
 30 PGLYRP1, una proteína de 196 aminoácidos de longitud, altamente conservada, que consiste en un péptido señal y un dominio de unión a peptidoglucano, se expresa en neutrófilos y se libera tras su activación. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden regular negativamente la liberación de citocinas proinflamatorias de células mieloides. Los anticuerpos de la presente invención pueden bloquear la liberación de TNFalfa, 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
 35 indicadora, como se desvela en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse tanto a TREM-1 humano como a TREM-1 de otra especie distinta de un ser humano. El término "TREM-1", como se usa en el presente documento, abarca por lo tanto cualquier forma de origen natural de TREM-1 que puede derivar de cualquier organismo adecuado. Por ejemplo,
 40 TREM-1 para su uso como se describe en el presente documento puede ser TREM-1 de vertebrado, 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, oveja, cerdo o camello). Preferentemente, el TREM-1 es SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano). El TREM-1 puede ser una forma madura de TREM-1 tal como una proteína de TREM-1 que ha
 45 experimentado un procesamiento postraducciona dentro de una célula adecuada. Dicha proteína de TREM-1 madura puede, por ejemplo, estar glucosilada. El TREM-1 puede ser una proteína de TREM-1 de longitud completa.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos monoclonales, en el sentido de que pueden derivar directa o indirectamente de un único clon de un linfocito B. Los anticuerpos de TREM-1 pueden producirse, explorarse y
 50 purificarse usando, por ejemplo, los métodos descritos en los Ejemplos. Brevemente, un ratón adecuado tal como un ratón con desactivación (KO) de TREM-1 o TREM-1/TREM-3 puede inmunizarse con TREM-1, una célula que expresa TREM-1 o una combinación de ambos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales en el sentido de ser una mezcla de anticuerpos
 55 monoclonales de acuerdo con la presente invención.

Puede realizarse exploración primaria de sobrenadantes de hibridoma usando ELISA directo o FMAT y puede realizarse exploración secundaria usando citometría de flujo. Después pueden explorarse sobrenadantes de
 60 hibridoma positivos en un ensayo de gen indicador.

Los anticuerpos pueden expresarse de forma recombinante en células procariotas o eucariotas. La célula procariótica 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 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
 65 artiodáctilo (tal como una vaca, oveja, cerdo o camello). Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitación, células HEK293, células CHO y células HELA. También pueden producirse anticuerpos de TREM-1

por medio de otros métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como una presentación en fagos o una presentación en levadura.

Una vez producidos, los anticuerpos pueden explorarse con respecto a unión a, por ejemplo, TREM-1 de longitud completa o mutantes del mismo usando los métodos descritos en los Ejemplos.

La memoria descriptiva desvela un método para identificar un anticuerpo de TREM-1 funcional. Los anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 y que tienen cualquier efecto sobre la activación de TREM-1 y señalización corriente abajo se denominan en el presente documento "anticuerpos de TREM-1 funcionales". Un anticuerpo de TREM-1 "funcional" en el presente documento se refiere a un anticuerpo que es capaz de bloquear o estimular TREM-1. El método de identificación de un anticuerpo de TREM-1 funcional comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incubaba con un agente modificador de TREM-1; (c) poner en contacto el cocultivo de (b) con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor que o mayor que la actividad medida en (b).

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 de Fc, o parte del mismo. La construcción indicadora de (a) puede ser cualquier construcción que pueda activarse mediante la proteína de señalización y generar una señal reconocible. Las construcciones indicadoras adecuadas comprenden un factor de transcripción y un gen indicador. La proteína de señalización puede señalar mediante un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en NFAT y NFkB. El gen indicador es un gen que no se expresa de forma nativa en dicha primera célula y puede ser un gen que codifique β -galactosidasa, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP) o cloranfenicol transferasa. Dicha primera célula puede transfectarse con un factor de transcripción y un gen indicador usando métodos que se conocen bien en la técnica.

La "célula indicadora BWZ/hTREM-1" descrita en los Ejemplos es un ejemplo de una "primera célula".

El agente modificador de (b) puede ser un ligando de TREM-1 o un neutrófilo activado. El "anticuerpo de 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 indicadora. Un ejemplo de dicha señalización es la luminiscencia provocada por producción de LacZ β -lactamasa luciferasa conducida por NFAT.

El método puede adaptarse para identificar un anticuerpo de bloqueo de TREM-1. El método para identificar un anticuerpo de bloqueo de TREM-1 comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incubaba con un neutrófilo activado; (c) poner en contacto el cocultivo de la primera célula y el neutrófilo activado con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor que la actividad medida en (b).

El método puede también adaptarse para identificar un anticuerpo estimulante de TREM-1. El método para identificar un anticuerpo estimulante de TREM-1 comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula; (c) poner en contacto/incubar dicha célula con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea mayor que la actividad de la medida en (b).

La presente invención se refiere a anticuerpos de bloqueo de TREM-1 como se definen en las reivindicaciones que pueden identificarse por medio del método, desvelado en el presente documento, de identificación de un anticuerpo de bloqueo. Cuando se ensaya usando el método descrito anteriormente y en los Ejemplos, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede, a una concentración de menos de 100 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 90 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 80 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 70 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 60 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 50 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 40 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 30 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 20 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 10 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 5 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 1 $\mu\text{g/ml}$, ser capaz de reducir la actividad de dicha primera célula en 50 %, tal como 60 %, tal como 70 %, tal como 80 %, tal como 90 %, tal como 95 %, tal como 100 %. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser capaz de extinguir completamente la actividad de la primera célula. Cuando se ensaya usando el método descrito anteriormente y en los Ejemplos, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede, a una concentración de menos de 1 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,9 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,8 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,7 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,6 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,4 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, tal como menos de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, ser capaz de extinguir la actividad de la primera célula.

La presente invención también se refiere a anticuerpos de bloqueo de TREM-1 como se define en las reivindicaciones que pueden identificarse por otro medio distinto del método desvelado en el presente documento.

El término "anticuerpo" en el presente documento se refiere a una proteína, derivada de una secuencia de

inmunoglobulina de línea germinal, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno (TREM-1) o una parte del mismo. El término incluye anticuerpos de longitud completa de cualquier clase o isotipo (es decir, IgA, IgE, IgG, IgM y/o IgY) y cualquier cadena individual 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 comprenden habitualmente al menos cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas por enlaces disulfuro. Una subclase de inmunoglobulina de interés farmacéutico particular es la familia de IgG. En seres humanos, la clase IgG puede subdividirse en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, basándose en la secuencia de sus regiones constantes de cadena pesada. Las cadenas ligeras pueden dividirse en dos tipos, kappa y lambda, basándose en diferencias en su composición de secuencia. Las moléculas de IgG están compuestas de dos cadenas pesadas, entrelazadas por dos o más enlaces disulfuro, y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada por 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 pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Las regiones VH y VL están compuestas normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras 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 tejidos o factores hospedadores, incluyendo pero sin limitación diversas células del sistema inmunitario (células efectoras), receptores de Fc y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Los anticuerpos de la presente invención pueden aislarse. La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha separado y/o recuperado de otro componente u otros componentes en el ambiente en el que se produjo y/o que se ha purificado de una mezcla de componentes presentes en el ambiente en el que se produjo.

Ciertos fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos pueden ser adecuados en el contexto de la presente invención, ya que se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno, tal como TREM-1, como se describe en el presente documento. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F (ab)₂, F (ab')₂, F(ab)S, Fv (normalmente los dominios VL y VH de una única rama de un anticuerpo), Fv monocatenario (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 fragmentos dAb (normalmente un dominio VH); dominios VH, VL, VhH y V-NAR; moléculas monovalentes que comprenden una única cadena VH y una única cadena VL; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, 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 restos de unión a antígeno o polipéptidos pueden asociarse o unirse entre sí para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Se han descrito diversos tipos de fragmentos de anticuerpos o se han revisado, por ejemplo, en Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005; 2S: 1126-1136; documento WO2005040219 y Solicitudes de Patente de Estados Unidos publicadas 20050238646 y 20020161201. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos pueden explorarse con respecto a su utilidad de la misma manera que anticuerpos intactos.

Un anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tengan regiones variables en las que al menos una parte de una región marco conservada y/o al menos una parte de una región CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, un anticuerpo humano puede tener regiones variables en las que las regiones tanto de marco conservado como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse por 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 con una célula inmortalizada.

Pueden aislarse anticuerpos humanos de bibliotecas de secuencias construidas sobre selecciones de secuencias de línea germinal humana, diversificadas adicionalmente con diversidad de secuencia natural y sintética.

Pueden prepararse anticuerpos humanos por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido de transformación

de los linfocitos con virus de Epstein-Barr.

La expresión “derivado de anticuerpo humano” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, tal como un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión “anticuerpo humanizado”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una o más secuencias (regiones CDR o partes de las mismas) que derivan de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado es, por lo tanto, una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que al menos restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de un anticuerpo de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad, composición de secuencia y funcionalidad deseadas. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Un ejemplo de dicha modificación es la introducción de una o más de las denominadas retromutaciones, que son normalmente restos de aminoácidos derivados del anticuerpo donante. Puede llevarse a cabo humanización de un anticuerpo usando técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, editado por Benny K. C. Lo). Un marco conservado de receptor humano adecuado para el dominio variable tanto de cadena ligera como de cadena pesada puede identificarse, por ejemplo, mediante homología de secuencia o estructural. Como alternativa, pueden usarse marcos conservados receptores fijos, por ejemplo, basados en el conocimiento de la estructura, propiedades biofísicas y bioquímicas. Los marcos conservados receptores pueden ser derivados de línea germinal o derivados de una secuencia de anticuerpo madura. Las regiones CDR del anticuerpo donante pueden transferirse por injerto de CDR. El anticuerpo humanizado con injertos de CDR puede optimizarse adicionalmente por ejemplo por afinidad, funcionalidad y propiedades biofísicas mediante la identificación de posiciones de marco conservado críticas cuando la reintroducción (retromutación) del resto de aminoácido del anticuerpo donante influye beneficiosamente en las propiedades del anticuerpo humanizado. Además de las retromutaciones derivadas de anticuerpo donante, el anticuerpo humanizado puede modificarse técnicamente mediante la introducción de restos de línea germinal en las regiones CDR o marco conservado, eliminación de epítomos inmunogénicos, mutagénesis dirigida, maduración de afinidad, etc.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá al menos uno, normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y en el que todos o sustancialmente todos los restos FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también, opcionalmente, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

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.

La expresión “anticuerpo quimérico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente por ingeniería genética, a partir de genes de región constante y variable de inmunoglobulina que se originan de diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos.

La región del fragmento cristizable (“región Fc”/“dominio Fc”) de un anticuerpo es la región N terminal de un anticuerpo, que comprende los dominios CH2 y CH3 constantes. El dominio Fc puede interactuar con receptores de superficie celular denominados receptores de Fc, así como algunas proteínas del sistema del complemento. La región Fc permite que los anticuerpos interactúen con el sistema inmunitario. En un aspecto de la invención, los anticuerpos como se definen en las reivindicaciones pueden modificarse técnicamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más de sus propiedades funcionales, tales como semivida en suero, fijación del complemento, unión a receptor de Fc, estabilidad de proteínas y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno, o ausencia de la misma, entre otras. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden unirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Un anticuerpo IgG1 puede portar un dominio Fc modificado que comprende uno o más, y quizás todas las siguientes mutaciones que den como resultado afinidad reducida por ciertos receptores de Fc (L234A, L235E y G237A) y en fijación del complemento mediada por C1q reducida (A330S y P331S), respectivamente (numeración de restos de acuerdo con el índice de EU).

El isotipo de un anticuerpo de la invención puede ser IgG, tal como IgG1, tal como IgG2, tal como IgG4. Si se desea, la clase de un anticuerpo puede “cambiarse” por técnicas conocidas. Por ejemplo, un anticuerpo que se produjo originalmente como una molécula IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG. También pueden usarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase IgG a otra, por ejemplo: de IgG1 a IgG2 o IgG4; de IgG2 a IgG1 o IgG4; o de IgG4 a IgG1 o IgG2. También puede realizarse modificación técnica de anticuerpos para generar moléculas quiméricas de región constante, por combinación de regiones de diferentes subclases de IgG.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumente o se reduzca. Este enfoque se describe adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.677.425 de Bodmer *et al.*

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 IgG4, el resto S228 (numeración de restos de acuerdo con el índice de EU) puede mutarse a un resto de prolina (P) para estabilizar la formación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en la bisagra (véase, por ejemplo, Angal *et al.*, Mol Immunol. 1995; 30: 105-8).

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos también pueden definirse con respecto a sus regiones determinantes de complementariedad (CDR). La expresión "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 restos de aminoácidos implicados en la unión a antígeno. La región de hipervariabilidad o las CDR pueden identificarse como las regiones con la mayor variabilidad en alineamientos de aminoácidos de dominios variables de anticuerpo. Pueden usarse bases de datos para identificación de CDR tales como la base de datos de Kabat, definiéndose, por ejemplo, las CDR por comprender los restos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (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 Estados Unidos, Publicación de NIH n.º 91-3242). Como alternativa las CDR pueden definirse como los restos de un "bucle hipervariable" (restos 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 restos de aminoácidos en esta región se realiza por el método descrito en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Expresiones tales como "posición de Kabat", "resto de Kabat" y "de acuerdo con 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 o más aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, un marco conservado (FR) o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (resto 52a, 52b y 52c de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de CDR H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto de FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "convencional".

La expresión "restos de región marco conservada" o "FR" se refiere a los restos de aminoácidos de VH o VL que no están dentro de las CDR, como se define en el presente documento.

El anticuerpo m14F69 tiene una secuencia de cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO: 2 y una secuencia de cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo de la invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo m14F69 tiene las secuencias de 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. Un anticuerpo de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR. Un anticuerpo de la invención puede comprender los aminoácidos 101 a 110 de SEQ ID NO: 2.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (TYAMH) de SEQ ID NO: 2, en la que uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR2 de los aminoácidos 50 a 68 (RIRTKSSNYATYYADSVKD) de SEQ ID NO: 2, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR3 de los aminoácidos 101 a 110 (DMGQRRQFAY) de SEQ ID NO: 2, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR1 de los aminoácidos 24 a 38 (RASESVDTFDYSFLH) de SEQ ID NO: 3, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR2 de los aminoácidos 54 a 60 (RASNLES) de SEQ ID NO: 3, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDR3 de los

aminoácidos 93 a 101 (QQSNEDPYT) de SEQ ID NO: 3, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

El anticuerpo mAb 0170 tiene una secuencia de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 4 y una secuencia de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 5. Un anticuerpo de la invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada y/o esta secuencia de cadena ligera. El anticuerpo mAb 0170 tiene las secuencias de CDR mostradas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 4 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 5. Un anticuerpo de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR.

El anticuerpo mAb 0122 tiene una secuencia de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 6 y una secuencia de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 7. Un anticuerpo de la divulgación puede comprender esta secuencia de cadena pesada y/o esta secuencia de cadena ligera. El anticuerpo mAb 0122 tiene las secuencias de CDR mostradas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 6 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 7. Un anticuerpo de la divulgación puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRH1 de los aminoácidos 31 a 35 (TYAMH) de SEQ ID NO: 4, en la que uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un resto de aminoácido diferente.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRH2 de los aminoácidos 50 a 68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) de SEQ ID NO: 4, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRH3 de los aminoácidos 101 a 110 (DMGIRRQFAY) de SEQ ID NO: 4, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una secuencia de CDRH3 de los aminoácidos 101 a 110 (DMGQRRQFAY) de SEQ ID NO: 6, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRL1 de los aminoácidos 24 a 38 (RASESVDTFDYSFLH) de SEQ ID NO: 5, en la que uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRL2 de los aminoácidos 54 a 60 (RASNLES) de SEQ ID NO: 5, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

La cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de CDRL3 de los aminoácidos 93 a 101 (QQSNEDPYT) de SEQ ID NO: 5, en la que uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

El anticuerpo m14F128 tiene una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 9. Un anticuerpo de la invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo m14F128 tiene las secuencias de CDR mostradas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 8 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 9. Un anticuerpo de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR.

El anticuerpo m14F113 tiene una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 11. Un anticuerpo de la invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo m14F113 tiene las secuencias de CDR mostradas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 68 y 101 a 110 de SEQ ID NO: 10 y los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de SEQ ID NO: 11. Un anticuerpo de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR. Un anticuerpo de la invención puede comprender los aminoácidos 101 a 110 de SEQ ID NO: 10.

El término "antígeno" (Ag) se refiere a la entidad molecular usada para inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo (Ab) que reconoce el Ag. En el presente documento, Ag se denomina más ampliamente y se pretende en general que incluya moléculas diana que el Ab reconoce específicamente, incluyendo por lo tanto fragmentos o miméticos de la molécula usada en el proceso de inmunización, u otro proceso, por ejemplo, presentación en fagos, usado para generar el Ab.

El término “epítipo”, 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). En general, “epítipo” se refiere al área o la región en un Ag a la que se une específicamente un Ab, es decir, el área o la región en contacto físico con el Ab. El contacto físico puede definirse mediante diversos criterios (por ejemplo, un punto de corte de distancia de 2-6 Å, tal como 3 Å, tal como 4 Å, tal como 5 Å; o accesibilidad al disolvente) para átomos en las moléculas de Ab y Ag. Un epítipo proteico puede comprender restos de aminoácidos en el Ag que están implicados directamente en la unión a un Ab (también denominado el componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácidos del Ag que están bloqueados eficazmente por el Ab, es decir, restos de aminoácidos dentro de la “superficie de disolvente excluido” y/o la “huella” del Ab.

El término epítipo en el presente documento comprende ambos tipos de región de unión en cualquier región particular de TREM-1 que se una específicamente con un anticuerpo de TREM-1. TREM-1 puede comprender varios epítipos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, epítipos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos localizados cerca entre sí en la conformación de TREM-1 madura y epítipos postraduccionales que consisten, completamente o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente a TREM-1, tales como grupos de carbohidratos.

El epítipo para un par de anticuerpos (Ab)/antígeno (Ag) dado puede describirse y caracterizarse a niveles diferentes de detalle usando diversos métodos de mapeo de epítipos experimentales y computacionales. Los métodos experimentales incluyen mutagénesis, cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno deuterio (HX-MS) y diversos métodos de unión de competición; métodos que se conocen en la técnica. Ya que cada método se basa en un principio único, la descripción de un epítipo está ligada íntimamente al método por el que se ha determinado. Por lo tanto, dependiendo del método de mapeo de epítipos empleado, el epítipo para un par Ab/Ag dado puede describirse de forma diferente.

En su nivel más detallado, el epítipo para la interacción entre el Ag y el Ab puede describirse por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción Ag-Ab, así como información acerca de sus contribuciones relativas a la termodinámica de unión. En un nivel menos detallado, el epítipo puede caracterizarse por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre el Ag y el Ab. En un nivel aún menos detallado el epítipo puede caracterizarse por los restos de aminoácidos que lo comprenden como se define por un criterio específico tal como la distancia entre o la accesibilidad al disolvente de átomos en el complejo Ab:Ag. En un nivel aún menos detallado el epítipo puede caracterizarse mediante la función, por ejemplo mediante unión de competición a otros Ab. El epítipo también puede definirse más genéricamente por comprender restos de aminoácidos para los que la sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el Ab y el Ag.

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 epítipo se define específicamente en el presente documento, a no ser que se especifique de otro modo o el contexto lo contradiga, como restos de TREM-1 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir un átomo distinto de hidrógeno) dentro de una distancia de, 4 Å desde un átomo pesado en el Ab.

A partir del hecho de que se obtienen descripciones y definiciones de epítipos, dependiendo del método de mapeo de epítipos usado, a diferentes niveles de detalle, se concluye que la comparación de epítipos para diferentes Ab en el mismo Ag puede realizarse de forma similar a diferentes niveles de detalle.

Se dice que los epítipos descritos en el nivel de aminoácidos, por ejemplo determinado a partir de una estructura de rayos X, son idénticos y contienen el mismo conjunto de restos de aminoácidos. Se dice que los epítipos solapan si al menos un aminoácido está compartido por los epítipos. Se dice que los epítipos están separados (son únicos) si los epítipos no comparten ningún resto de aminoácido.

Los epítipos también pueden definirse indirectamente, por medio de comparación de la cinética de unión de anticuerpos a TREM-1 humano de tipo silvestre con los de variantes de TREM-1 humano que tienen mutaciones de alanina en epítipos anticipados. La afinidad reducida o unión anulada de un anticuerpo por variantes de TREM-1 humano en el que se ha reemplazado un resto de aminoácido con un resto de alanina indica que el aminoácido mutado contribuye a la interacción entre dicho anticuerpo y TREM-1 humano de tipo silvestre. Este enfoque proporciona una identificación negativa del epítipo. El método está comprometido en la definición eficaz del epítipo por el hecho de que el plegamiento erróneo o el desplegamiento de la proteína darían resultados similares a anulación de interacción. El análisis puede complementarse por 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 epítipos entre el anticuerpo que no reacciona de forma cruzada, por ejemplo, con TREM-1 de mono cynomolgus y el anticuerpo con reacción cruzada.

También puede proporcionarse identificación indirecta del epítipo por medio de medición de la unión del anticuerpo

- (o fragmento de anticuerpo) a variantes del antígeno de tipo silvestre (TREM-1). Si un anticuerpo o fragmento del mismo se une, por ejemplo, a TREM-1 humano pero no a TREM-1 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 resto o los restos de aminoácidos sustituidos son importantes para la interacción del anticuerpo con el antígeno. Del mismo modo, la afinidad aumentada para variantes humanizadas de TREM-1 de mono cynomolgus, de un anticuerpo anti TREM-1 humano (o su fragmento Fab) que tiene una unión más débil con TREM-1 de mono cynomolgus en comparación con TREM-1 humano, puede proporcionar información sobre la identidad de restos que componen el epítipo de unión.
- El efecto de las mismas mutaciones en cualquier anticuerpo con reacción cruzada dado hace posible diferenciar entre posible plegamiento erróneo de la proteína (anulación de la unión a ambos anticuerpos) y pérdida de interacción en TREM-1 humano (unión a uno de los anticuerpos y unión anulada al otro anticuerpo), mientras que se proporciona de forma inequívoca información sobre las diferencias de epítipos entre el anticuerpo que no reacciona de forma cruzada y el anticuerpo con reacción cruzada en un nivel de aminoácidos.
- Los anticuerpos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones pueden ser capaces de unirse a variantes de TREM-1 humano. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse a K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 13), como se determina usando, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial.
- Los anticuerpos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones pueden ser capaces de unirse a variantes de TREM-1 de mono cynomolgus. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse a A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 14), como se determina usando, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de unirse a A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 15), como se determina usando, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial.
- Un anticuerpo desvelado en el presente documento puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1, en el que dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente a (i) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A21, T22, K23, L24, T25, E26 y (ii) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, I57, I58, R59, D60, G61, E62, M63 y (iii) al menos un resto de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en C113, V114, I115, Y116, Q117, P118 y P119 de TREM-1 humano.
- Un anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos D38 a F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando, por ejemplo, HX-MS.
- Un anticuerpo de la invención tiene un epítipo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los restos de aminoácidos D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 y L45 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano) y uno, dos o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los E46, K47 y F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando, por ejemplo, HX-MS.
- Un anticuerpo de la invención puede tener un epítipo que comprende uno, dos, tres o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los D42, E46, D92 y H93 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando variantes de TREM-1 y resonancia de plasmón superficial.
- Un anticuerpo de la divulgación puede tener un epítipo que comprende al menos los restos de aminoácidos E46 y/o D92 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando variantes de TREM-1 y resonancia de plasmón superficial.
- Un anticuerpo desvelado en el presente documento puede comprender además uno, dos o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los L31, I86 y V101 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano).
- Un anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede ser capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos E19 a L26 de TREM-1 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 12), o los aminoácidos correspondientes de SEQ ID NO: 21, como se determina usando, por ejemplo, HX-MS.
- Un anticuerpo de la divulgación puede ser capaz de unirse específicamente a TREM-1 humano, en el que el epítipo de dicho anticuerpo comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o todos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48 y A49 de SEQ ID NO: 1.
- El epítipo del anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede comprender el D42 de SEQ ID NO: 1. El epítipo del anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede comprender el E46 de SEQ ID NO: 1. El epítipo de dicho anticuerpo puede comprender los V39, C41, D42, Y43, L45 de SEQ ID NO: 1. El epítipo de dicho anticuerpo puede comprender los E46, K47 y A49 de SEQ ID NO: 1. El epítipo de dicho

anticuerpo puede comprender además el F48 de SEQ ID NO: 1.

La definición del término “parátipo” deriva de la definición anterior de “epítipo” invirtiendo la perspectiva. Por lo tanto, el término “parátipo” se refiere al área o la región del Ab al que se une un Ag de forma específica, es decir con la que entra en contacto físico con el Ag.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X, definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, tal como un fragmento Fab, y su Ag, el término parátipo se define específicamente en el presente documento, a no ser que se especifique de otro modo o se contradiga por el contexto, como restos de Ag caracterizados por tener un átomo pesado (es decir un átomo distinto de hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å desde un átomo pesado en TREM-1.

El epítipo y parátipo para un par de anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado puede identificarse por métodos rutinarios. Por ejemplo, la localización general de un epítipo puede determinarse evaluando la capacidad de un anticuerpo para unirse a diferentes fragmentos o polipéptidos de TREM-1 variantes. Los aminoácidos específicos dentro de TREM-1 que entran en contacto con un anticuerpo (epítipo) y los aminoácidos específicos en un anticuerpo que entra en contacto con TREM-1 (parátipo) también pueden determinarse usando métodos rutinarios. Por ejemplo, el anticuerpo y la molécula diana pueden combinarse y el complejo Ab:Ag puede cristalizarse. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción entre el anticuerpo y su diana.

Pueden caracterizarse anticuerpos que se unen al mismo antígeno con respecto a su capacidad para unirse a su antígeno común simultáneamente y pueden someterse a “unión de competición”/“agrupamiento”. En el presente contexto, el término “agrupamiento” se refiere a un método para agrupar anticuerpos que se unen al mismo antígeno. El “agrupamiento” de anticuerpos puede basarse en la unión de competición de dos anticuerpos con su antígeno común en ensayos basados en técnicas convencionales tales como resonancia de plasmón superficial (RPS), ELISA o citometría de flujo.

El “grupo” de un anticuerpo se define usando un anticuerpo de referencia. Si un segundo anticuerpo es incapaz de unirse a un antígeno al mismo tiempo que el anticuerpo de referencia, se dice que el segundo anticuerpo pertenece al mismo “grupo” que el anticuerpo de referencia. En este caso, el anticuerpo de referencia y el segundo anticuerpo se unen de forma competitiva a la misma parte de un antígeno y se denominan “anticuerpos competidores”. 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 “grupo” separado. En este caso, el anticuerpo de referencia y el segundo anticuerpo no se unen de forma competitiva a la misma parte de un antígeno y se denominan “anticuerpos no competidores”.

El “agrupamiento” de anticuerpos no proporciona información directa acerca del epítipo. Los anticuerpos competidores, es decir anticuerpos que pertenecen al mismo “grupo”, pueden tener epítopos idénticos, epítopos solapantes o incluso epítopos separados. Esto último sucede si el anticuerpo de referencia unido a su epítipo en el antígeno ocupa el espacio requerido para que el segundo anticuerpo entre en contacto con su epítipo en el antígeno (“impedimento estérico”). Los anticuerpos no competidores tienen en general epítopos separados.

Un anticuerpo de la invención puede competir con mAb 0170 por la unión a TREM-1 humano, como se define en las reivindicaciones. Un anticuerpo de la invención puede competir con el mAb 0170 por la unión a TREM-1 de mono cynomolgus, como se define en las reivindicaciones. En otras palabras, un anticuerpo de la invención puede pertenecer al mismo “grupo” que mAb 0170.

La expresión “afinidad de unión” en el presente documento se refiere a una medida de la fuerza de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno. La expresión “afinidad de unión” se usa para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca).

La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno, mediante una interacción monovalente puede cuantificarse por la determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_D). A su vez, la K_D puede determinarse por la medición de la cinética de la formación y disociación del complejo, por ejemplo por el método de RPS. 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 se relaciona con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

Siguiendo la definición anterior, las afinidades de unión asociadas a diferentes interacciones moleculares, tales como comparación de la afinidad de unión de diferentes anticuerpos por un antígeno dado, pueden compararse por comparación de los valores de K_D para los complejos de anticuerpo/antígeno individuales.

Un anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede unirse a TREM-1 humano con una afinidad (K_D) que es de 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, como se determina usando resonancia de plasmón

superficial. Un anticuerpo de la invención como se define en las reivindicaciones puede unirse a TREM-1 de mono cynomolgus con una afinidad (KD) que es de 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, como se determina usando resonancia de plasmón superficial.

La expresión "especificidad de unión" del 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 altamente homólogos (o epítomos). Por el contrario, los anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a TREM-1 no son capaces de unirse a moléculas diferentes. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden no ser capaces de unirse a Nkp44.

La especificidad de una interacción y el valor de una constante de unión en equilibrio pueden determinarse directamente por métodos bien conocidos. Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la capacidad de los ligandos (tales como anticuerpos) para unirse a sus dianas e incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias de Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y afinidad de unión del anticuerpo también pueden evaluarse por ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como RPS.

Puede realizarse un ensayo de unión competitiva en el que la unión del anticuerpo a la diana se compara con la unión de la diana a otro ligando de esa diana, tal como otro anticuerpo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones y formulaciones que comprenden moléculas desveladas en el presente documento, tales como los anticuerpos de TREM-1 de la invención, y los polinucleótidos, vectores y células descritos en el presente documento. Por ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de TREM-1 de la invención como se definen en las reivindicaciones, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En consecuencia, un objetivo de la divulgación es proporcionara una formulación farmacéutica que comprende dicho anticuerpo de 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 el que dicha formulación tiene un 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 de tampón, un conservante, un agente de tonicidad, un agente quelante, un estabilizador y/o un tensioactivo, así como diversas combinaciones de los mismos. El uso de conservantes, agentes isotónicos, agentes quelantes, estabilizantes y tensioactivos en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos en la materia. Puede hacerse referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa. Dicha formulación es normalmente una solución o una suspensión, pero también puede incluir coloides, dispersiones, emulsiones y materiales multifase. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 50 % p/p de agua. De forma similar, la expresión "solución acuosa" se define como la solución que comprende al menos un 50 % p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50 % p/p de agua.

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

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de dicho anticuerpo, y un tampón, en el que el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o más, y en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

Los anticuerpos de TREM-1 de la presente invención y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos pueden usarse para tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como las siguientes; enfermedad inflamatoria del intestino (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 de tipo I, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple (EM), miocarditis autoinmunitaria, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad de injerto contra hospedador, síndrome de Sjogren, nefritis autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunitarias que son el resultado de inflamación aguda o crónica.

Los anticuerpos de TREM-1 de la invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con enfermedad inflamatoria del intestino. La Enfermedad Inflamatoria del Intestino (EII) es una enfermedad que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal de la boca al ano, provocando una amplia diversidad de síntomas. La EII causa principalmente dolor abdominal, diarrea (que puede ser hemorrágica), vómitos o pérdida de peso, pero también puede provocar complicaciones fuera del tracto gastrointestinal tales como erupciones cutáneas, artritis, inflamación del ojo, fatiga y falta de concentración. Los pacientes con EII pueden dividirse en dos clases principales,

los que tienen colitis ulcerosa (CU) y los que tienen enfermedad de Crohn (EC). La EC generalmente implica el íleon y el colon, y puede afectar a cualquier región del intestino pero es con frecuencia discontinua (áreas de foco de enfermedad se propagan por todo el intestino). La CU implica siempre al recto (colónica) y es más continua. En EC, la inflamación es transmural, dando como resultado abscesos, fistulas y estrechamientos, mientras que en CU, la inflamación se restringe normalmente a la mucosa. No hay ninguna cura farmacéutica o quirúrgica conocida para enfermedad de Crohn, mientras que algunos pacientes con CU pueden curarse por la retirada quirúrgica del colon. Las opciones de tratamiento están restringidas a combatir los síntomas, mantener la remisión y evitar la recaída. La eficacia en la enfermedad inflamatoria del intestino en la clínica puede medirse como una reducción de la puntuación del índice de actividad de enfermedad de Crohn (IAEC) para EC que es una escala de puntuación basada en ensayos de laboratorio y un cuestionario de calidad de vida. En modelos animales, la eficacia se mide principalmente por aumento de peso y también un índice de actividad de enfermedad (IAE), que es una combinación de consistencia de las heces, peso y sangre en las heces.

Los anticuerpos de TREM-1 de la 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 todo el cuerpo, si no a todo el cuerpo, y es una de las formas más habituales de artritis. Se caracteriza por inflamación de las articulaciones, que provoca dolor, rigidez, calor, rojez e hinchazón. Esta inflamación es una consecuencia de la invasión por parte de células inflamatorias de las articulaciones, y estas células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado, esta inflamación puede conducir a daño grave del hueso y del cartílago y a deterioro de las articulaciones y dolor grave, junto con otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineamiento dando como resultado dolor y pérdida de movimiento.

Hay varios modelos animales para artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan una artritis inflamatoria que se asemeja a la artritis reumatoide humana. Ya que AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con AR, esto la hace un modelo adecuado para explorar compuestos antiinflamatorios humanos potenciales. La eficacia de este modelo se mide por reducción de la hinchazón de las articulaciones. La eficacia en AR en la clínica se mide por la capacidad para reducir los síntomas en pacientes lo que se mide como una combinación de hinchazón de las articulaciones, tasa de sedimentación de eritrocitos, niveles de proteínas C reactivas y niveles de factores de suero, tales como anticuerpos antiproteína citrulinada.

Los anticuerpos de TREM-1 de la invención pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de individuos con psoriasis. La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por células T de la piel que puede provocar incomodidad considerable. Es una enfermedad para la que no hay en la actualidad ninguna cura y afecta a personas de todas las edades. Aunque los individuos con psoriasis leve pueden con frecuencia combatir 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, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes tienen habitualmente reaparición de psoriasis, y en algunos casos se reanuda poco después de detenerse la terapia inmunosupresora. Un modelo recientemente desarrollado de psoriasis basado en la transferencia de células T CD4+ imita muchos aspectos de la psoriasis humana y por lo tanto puede usarse para identificar compuestos adecuados para su uso en el tratamiento de psoriasis (Davenport *et al.*, Internat. Immunopharmacol 2: 653-672, 2002). La eficacia en este modelo se mide por reducción de la patología cutánea usando un sistema de puntuación. De forma similar, la eficacia en pacientes se mide por una reducción de la patología cutánea.

Los anticuerpos de TREM-1 de la 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 se produce en un subconjunto de pacientes con psoriasis. En estos pacientes, la patología/los síntomas de la piel están acompañados de una hinchazón de las articulaciones similar a la vista en artritis reumatoide. Presenta áreas rojas, elevadas, desiguales de inflamación cutánea con escamas. La psoriasis afecta con frecuencia a las puntas de los codos y las rodillas, el cuero cabelludo, el ombligo y alrededor de las áreas genitales o el ano. Aproximadamente el 10 % de los pacientes que tienen psoriasis también desarrollan una inflamación asociada de sus articulaciones.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la terapia médica de cualquier ser humano u otro sujeto animal que lo necesite. Se espera que dicho sujeto se haya sometido a un examen físico por un médico o practicante médico veterinario, que haya proporcionado un diagnóstico tentativo o definitivo que indicaría que el uso de dicho tratamiento sea eficaz para la salud de dicho ser humano u otro sujeto animal. El momento y fin de dicho tratamiento puede variar de un individuo a otro, según muchos factores, tales como el estado de la salud del sujeto. Por lo tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

Con respecto a la presente divulgación, los tratamientos profilácticos, paliativos, sintomáticos y/o curativos pueden representar aspectos separados de la divulgación.

Un anticuerpo de la invención puede ser para administración por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, tal como por vía intramuscular, tal como por vía subcutánea. Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede ser para administración mediante una vía no parenteral, tal como por vía peroral o tópica. Un anticuerpo de la invención

puede ser para administración profiláctica. Un anticuerpo de la invención puede ser para administración terapéutica (a demanda).

Realizaciones a modo de ejemplo de la divulgación

1. Un método para identificar un anticuerpo de TREM-1 funcional, que comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (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 cultivo de (b) con un anticuerpo de TREM-1 y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor que o mayor que la actividad medida en (b).
2. Un método para identificar un anticuerpo de bloqueo de TREM-1, que comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula cuando dicha célula se incuba con un neutrófilo activado; (c) poner en contacto el cultivo de la primera célula y el neutrófilo activado con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea menor que la actividad medida en (b).
3. El método de una cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que el agente modificador de (b) es un neutrófilo activado o un ligando de TREM-1.
4. Un método para identificar un anticuerpo de TREM-1 estimulante, que comprende (a) cultivar una primera célula que expresa TREM-1, una proteína de señalización y una construcción indicadora; (b) medir la actividad de la primera célula; (c) poner en contacto/incubar dicha célula con un anticuerpo de TREM-1; y (d) medir que la actividad de la primera célula sea mayor que la actividad medida en (b).
5. El método de una cualquiera de las realizaciones 1-4, en el que la primera célula es de origen hematopoyético.
6. El método de acuerdo con la realización 5, en el que la célula de origen hematopoyético es una célula mieloide.
7. El método de acuerdo con la realización 5, en el que la célula de origen hematopoyético es una célula T.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la proteína de señalización es DAP10.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la proteína de señalización es DAP12.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la proteína de señalización es TCR zeta.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la proteína de señalización es Fc gamma RIII.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la proteína de señalización es un receptor de Fc.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que la construcción indicadora comprende un factor de transcripción y un gen indicador.
14. El método de acuerdo con la realización 13, en el que dicho factor de transcripción es NFAT.
15. El método de acuerdo con la realización 14, en el que dicho factor de transcripción es NFkB.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13-15, en el que dicho gen indicador codifica β -galactosidasa.
17. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13-15, en el que dicho gen indicador codifica luciferasa.
18. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13-15, en el que dicho gen indicador codifica proteína verde fluorescente (GFP).
19. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 13-15, en el que dicho gen indicador es un gen que codifica cloranfenicol transferasa.
20. Un método para identificar un anticuerpo de bloqueo de TREM-1, que comprende (a) cultivar una célula T que expresa TREM-1, DAP12 y un gen que codifica luciferasa; (b) medir la luminiscencia de la célula T cuando esta se incuba con un neutrófilo activado; (c) poner en contacto el cocultivo de (b) con un anticuerpo de TREM-1 y (d) medir que la luminiscencia de la célula T sea menor que la actividad medida en (b).
21. El método de acuerdo con la realización 7, en el que dicha célula es una línea de células T BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ.
22. Un anticuerpo identificado por el método de una cualquiera de las realizaciones 1-3 y 5-21.

Realizaciones a modo de ejemplo de la invención

23. Un anticuerpo o fragmento del mismo que es capaz de unirse específicamente a y bloquear TREM-1 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de bloquear la activación inducida por PGLYRP1 de TREM-1, y tiene un epítipo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los restos de aminoácidos D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 y L45 y uno, dos o todos los restos de aminoácidos E46, K47, F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano).
24. El anticuerpo de acuerdo con cualquier realización 23, en el que dicho anticuerpo es capaz de prevenir o reducir la dimerización/multimerización de TREM-1.
25. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-24, en el que dicho anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre TREM-1 y su ligando.

26. El anticuerpo de acuerdo con la realización 23, en el que dicho anticuerpo también es capaz de unirse específicamente a y bloquear la función de TREM-1 de otra especie distinta de ser humano.

27. El anticuerpo de acuerdo con la realización 26, en el que el TREM-1 de otra especie es TREM-1 de mono cynomolgus.

28. El anticuerpo de acuerdo con la realización 26, en el que el TREM-1 de otra especie es TREM-1 de mono rhesus.

29. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-28, que es capaz de unirse específicamente a K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 13).

30. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-29, que es capaz de unirse específicamente a A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 14).

31. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-30, que es capaz de unirse específicamente a A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6 (SEQ ID NO: 15).

32. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 23-31, que compite con mAb 0170 por la unión a TREM-1 humano, en el que el mAb 0170 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

33. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-32, que compite con el mAb 0170 por la unión a TREM-1 de mono cynomolgus, en el que mAb 0170 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

34. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-33, que es capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos D38 a F48 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humana), como se determina usando, por ejemplo, HX-MS.

35. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-34, que es capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los restos de aminoácidos E38 a L45 de TREM-1 de mono cynomolgus, como se determina usando, por ejemplo, HX-MS.

36. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-35, que tiene un epítipo que comprende al menos los restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los D42, E46, D92 y H93 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando resonancia de plasmón superficial.

37. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-36, que tiene un epítipo que comprende al menos los restos de aminoácidos E46 y/o D92 de SEQ ID NO: 1 (TREM-1 humano), como se determina usando resonancia de plasmón superficial.

38. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-37, en el que dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente a (i) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los A21, T22, K23, L24, T25, E26 y (ii) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, I57, I58, R59, D60, G61, E62, M63, P64, K65, T66, L67, A68, C69, T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, I85 y (iii) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los C113, V114, I115, Y116, Q117, P118 y P119 de TREM-1 humano.

39. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-38, en el que dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente a (i) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los V39, K40, C41, D42, Y43, T44, L45, E46, K47, F48, A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56 y (ii) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, I85 y (iii) al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los C113, V114, I115, Y116, Q117, P118, P119.

40. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-39, cuya cadena pesada comprende una secuencia de CDRH3 correspondiente a los restos de aminoácidos 101 a 110 (DMGIRRQFAY) de SEQ ID NO: 4, en el que uno, dos o tres de dichos restos de aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

41. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la realización 40, que comprende además una secuencia de CDRH1 correspondiente a los restos de aminoácidos 31 a 35 (TYAMH) de SEQ ID NO: 4, en el que uno de estos restos de aminoácidos puede sustituirse por un resto de aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRH2 correspondiente a los aminoácidos 50 a 68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) de SEQ ID NO: 4, en el que uno, dos o tres de dichos aminoácidos pueden sustituirse por un resto de aminoácido diferente.

42. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-41, cuya cadena ligera comprende: una secuencia de CDRL1 correspondiente a los restos de aminoácidos 24 a 38 (RASESVDTFDYSFLH) de SEQ ID NO: 5, en el que uno, dos o tres de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRL2 correspondiente a los restos de aminoácidos 54 a 60 (RASNLES) de SEQ ID NO: 5, en el que uno o dos de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRL3 correspondiente a los restos de aminoácidos 93 a 101 (QQSNEDPYT) de SEQ ID NO: 5, en el que uno o dos de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

43. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 40-42, que comprende SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5.

44. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-43, que se une a TREM-1 humano con una afinidad de unión (KD) que es de 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, como se determina usando resonancia de plasmón superficial.

45. El anticuerpo de acuerdo con la realización 44, en el que dicha afinidad de unión (KD) es 1×10^{-10} M o menos.

46. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-45, que se une a TREM-1 de mono cynomolgus con una afinidad de unión (KD) que es de 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, como se determina usando resonancia de plasmón superficial.

47. El anticuerpo de acuerdo con la realización 46, en el que dicha afinidad de unión es 1×10^{-9} M o menos.

48. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-47, que es un IgG.

49. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-48 para su uso como un medicamento.

50. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23-48 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria y/o inflamación crónica.

51. El anticuerpo para uso de acuerdo con la realización 50, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

52. El anticuerpo para uso de acuerdo con la realización 50, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es enfermedad de Crohn.

53. El anticuerpo para uso de acuerdo con la realización 50, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es colitis ulcerosa.

54. El anticuerpo para uso de acuerdo con la realización 50, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis psoriásica.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no deberán interpretarse como limitantes adicionales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de una línea celular estable BWZ.36 TREM-1 humano:DAP12

La línea celular BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ (también denominada en el presente documento "célula indicadora BWZ/hTREM-1") se obtuvo de células T BW5147 (línea celular de linfoma de timo de *Mus musculus*, ATCC TIB-47, LGC Standards, Middlessex, Reino Unido) y contiene una construcción indicadora de LacZ regulada por cuatro copias del elemento promotor de NFAT (véase Karttunen, J. y Shastri, N. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3972-3976 y Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. y Herzenberg, L. A. (1990) Genes Dev. 4, 1823-1834). El vector TREM/DAP12/pMX-IRES (que codifica 786 pb de TREM-1 de un sitio SmaI a un sitio BamHI usando ADNc de TREM-1 (ID Referencia de Gene Bank: NM_018643.2, Sino Biological Inc., Beijing, China) como molde y oligo 5' TAGTAGGGATCCGCTGGTGCACAGGAAGG (SEQ ID NO: 16) y 5' TAGTAGGCGGCCGCTTCGTGGGCCTAGGGTAC (SEQ ID NO: 17) como cebadores clonados en el vector pIREShyg de n.º de Referencia de GenBank U89672 (cat n.º 6061-1, Clontech Laboratories, CA, EE.UU.) se transfirió en la línea celular de empaquetamiento PLAT-E (proporcionada por W. Yokoyama, Universidad de Washington; como alternativa, Cat. n.º RV-101, Cell Biolabs Inc, Bio-Mediator KY, Vantaa, Finlandia) usando reactivo de transfección Superfect (Cat. n.º 301305, Qiagen Nordic, Dinamarca). Se usaron sobrenadantes de PLAT-E que contenían partículas víricas TREM/DAP12/pMX-IRES para infectar células BWZ.36 de la siguiente manera: se cultivaron 2×10^5 células BWZ.36 en placas de 6 pocillos y el medio se reemplazó con 1,5 ml de sobrenadante que contenía las partículas víricas + 8 mg/ml de polibreno. Después de 6-8 horas, se añadieron 1,5 ml de medio normal a la placa y las células se incubaron durante 24 horas adicionales. Las líneas celulares BWZ.36 que expresaban de forma estable TREM-1 se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti TREM-1 (clon 21C7) y se aislaron por clasificación celular.

Ejemplo 2: Cultivo de una línea celular estable BWZ.36 TREM-1 humano:DAP12

Se cultivaron células indicadoras BWZ/hTREM-1 en RPMI 1640 sin rojo fenol (Cat n.º 11835, Gibco, Carlsbad CA, EE.UU.), complementado con FCS 10 % (Cat n.º 16140-071, Gibco, Nueva York, EE.UU.), Pen/Strep 1 % (Cat n.º 15070-06, Gibco), Piruvato Sódico 1 mM (Cat n.º 11360, Gibco), 2ME 5 μ M (Cat n.º 31350-010, Gibco) y L-Glutamina 2 mM (Cat n.º 25030, Gibco). No se requirió ninguna placa o recubrimiento especial. Se añadieron 10 ml de Versene (Cat n.º 15040, Gibco) para desprender las células que después se transfirieron a tubos, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron en RPMI 1640 nuevo sin rojo fenol. Estas células estuvieron entonces listas para su uso en un ensayo o recultivo para propagación adicional.

Ejemplo 3: Inmunización de ratones e identificación de mAb

Para generar anticuerpos que se unan con TREM-1 humano, se inmunizaron tanto ratones Balb/C de tipo silvestre como ratones con TREM-1 desactivado (KO) (fondo de C57BL/6) con TREM-1 humano (h) (SEQ ID NO: 1), células que expresan hTREM-1 (células BWZ.36) o una combinación de ambos. Se realizó exploración primaria por medio de ELISA directo en proteína hTREM-1 o por medio de FMAT, usando células BWZ.36 que expresaban hTREM-1. Se realizó exploración secundaria mediante citometría de flujo en células HEK293 que expresaban hTREM-1. Después se exploraron sobrenadantes de hibridoma positivos en el ensayo indicador de BWZ/hTREM-1 descrito en el Ejemplo 4.

Se obtuvo el mayor número de anticuerpos de bloqueo de ratones KO inmunizados con proteína hTREM-1 seis veces a intervalos de dos semanas, seguido de una inyección de refuerzo. En total, se aislaron más de 200 anticuerpos de hTREM-1, de los cuales se descubrió posteriormente que aproximadamente 70 tenían un efecto de bloqueo.

Todos los sobrenadantes de hibridomas específicos de TREM-1 se ensayaron en el ensayo indicador de BWZ/hTREM-1 primero como sobrenadantes y después como anticuerpos purificados, en titulación completa de 5000 ng/ml hasta 7 ng/ml, tanto como anticuerpos solubles como anticuerpos unidos a placa. Se usó sangre de una serie de donantes diferentes como una fuente de neutrófilos nuevos. Como ejemplo, la Figura 4 muestra anticuerpos de una fusión en la que la actividad en el ensayo indicador como actividad de bloqueo está en el eje x y la actividad agonista cuando el anticuerpo está unido a placa está en el eje y.

Ejemplo 4: Identificación de PGLYRP1 como un ligando de TREM-1 expresado por neutrófilos

Se identificó PGLYRP1 como un ligando de TREM-1 mediante el uso de inmunoprecipitación acoplada a espectroscopia de masas (IP-MS). Se usó un tetrámero TREM-1 soluble como una molécula "cebo" de afinidad para identificar un ligando. Brevemente, el tetrámero TREM-1-Fc (SEQ ID NO: 2) y por separado CD83-Fc (SEQ ID NO: 5) se incubaron cada uno a concentraciones finales de 100 µg/ml con 270 millones de neutrófilos humanos, se purificaron por sedimentación con dextrano como se ha descrito anteriormente, en 1 ml de PBS a 4 °C, 90 minutos con agitación suave. Después de sedimentar estas células, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de PBS con la inclusión del reticulador 3,3'-ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato] (DTSSP) (Thermo Scientific: 21578, Rockford, IL, EE.UU.) a una concentración de 2 mM y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 x con 1 ml de PBS seguido de lisis en 1 ml de tampón RIPA (Thermo Scientific, 89901, Rockford, IL, EE.UU.). El lisado se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para retirar materiales insolubles. Se inmunoprecipitaron proteínas de neutrófilos reticuladas con sondas acopladas a Fc del sobrenadante usando perlas de Proteína A Mag Sepharose™ (GE Healthcare Life Sciences, 28-9670-56, Piscataway, NJ, EE.UU.). Brevemente, se lavaron en primer lugar 50 µl de perlas con 200 µl de PBS, después se resuspendieron en 1 ml de lisado celular, se incubaron durante 60 minutos a 4 °C, se capturaron de forma magnética y se lavaron secuencialmente 2X con 200 µl de tampón RIPA después 3X con 200 µl de PBS. Después de retirar PBS de la captura magnética final, las proteínas se eluyeron de las perlas magnéticas usando 200 µl de tampón que contenía urea 8 M, Tris 100 mM (pH 8,0) y TCEP 15 mM (Thermo Scientific, 77720, Rockford, IL, EE.UU.) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, las perlas se capturaron y se transfirió sobrenadante a un filtro Microcon Ultracel YM-30 (Millipore, 42410, Billerica, MA, EE.UU.). Las muestras se centrifugaron a 14.000 x g, a 20 °C, durante 30-60 minutos hasta que no permaneció ningún líquido en la parte superior de la membrana de filtro. Las proteínas retenidas se alquilaron después con 100 µl de IAA (yodoacetamida) 50 mM en Urea 8 M durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. El filtro se lavó 2X con 100 µl de NH₄HCO₃ 50 mM y después se transfirió a un nuevo tubo de recogida. Se añadió 1 µg de tripsina (Promega, V5111, Madison, WI) en 60 µl de NH₄HCO₃ 50 mM seguido de incubación a 37 °C durante una noche. El producto de digestión triptica se recogió por centrifugación a 14.000 xg durante 30 minutos seguido de lavado del filtro con 50 µl de NH₄HCO₃ 50 mM. Se analizaron 10 µl del producto de digestión por LC/MS/MS usando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los datos se buscaron frente a la base de datos humana IPI (v3.81) usando el motor SEQUEST-Sorcerer (versión 4.0.4) (SageN, Milpitas, CA, EE.UU.) y después se procesaron posteriormente con Scaffold 3 (Software Proteome, Portland, OR, EE.UU.) para filtrar ID de proteínas con una tasa de falso descubrimiento de 1 %. Después de la resta del control negativo, se descubrió que PGLYRP1 era una proteína de alta confianza específicamente asociada con el tetrámero de hTREM-1. La inmunoprecipitación en los neutrófilos mostró que de las 148 proteínas identificadas, 72 proteínas se inmunoprecipitaban por la construcción de control (CD83) solamente, 73 de las proteínas eran idénticas para TREM-1 y CD83, mientras que solamente tres fueron específicas de TREM-1 (Figura 3). El experimento se repitió posteriormente usando neutrófilos de un donante diferente y se identificó de nuevo que PGLYRP1 interactuaba específicamente con hTREM-1.

Ejemplo 5: Replegamiento y purificación de PGLYRP1 humana expresada por *E. coli*

Se expresó PGLYRP1 humana como cuerpos de inclusión en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Las bacterias se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,5 % y se rompieron por ultrasonidos. El sedimento insoluble se lavó tres veces con Tris 50 mM, pH 8,0, TritonX-100 1 %, urea 2 M y una vez con Tris 50 mM pH 8,0, después se solubilizó en Tris-HCl 50 mM, clorhidrato

de guanidina 6 M, pH 7,4, DTT 1 mM (concentración final de la proteína 20 mg/ml). Para plegamiento *in vitro*, se diluyeron cuerpos de inclusión de PGLYRP1 humano solubilizados en Tris 50 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, cisteamina 5 mM, cistamina 0,5 mM, arginina 0,4 M (concentración final de proteína 1 mg/ml). Después de una noche a 4 °C, la mezcla de plegamiento se clarificó por centrifugación/filtración y después se diluyó 12 veces en MES 10 mM pH 3,5 para reducir la conductividad y el pH (pH final 5,8, conductividad ~6 mS/cm). La mezcla de plegamiento diluida se aplicó después a una columna de 5 ml Hitrap SP HP (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Suecia), seguido de un lavado con 5 volúmenes de columna con MES 50 mM pH 5,8. La PGLYRP1 humana unida se eluyó después con un gradiente lineal 0-60 % de MES 50 mM pH 5,8, NaCl 1 M en 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían PGLYRP1 humana replegada se agruparon y se concentraron a menos de 4 ml por unidades de centrifuga de Amicon ultra 15 (UFC 800324, EFPM 3.000 kDa, Millipore, Hellerup, Dinamarca). Se usó después una columna de 318 ml Hiload 26/60 Superdex 75 (17-1070-01 GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para pulir e intercambiar el tampón de las proteínas a solución salina tamponada con fosfato (PBS). La mayoría de proteínas PGLYRP1 humanas replegadas estaban en forma monomérica. Después de concentrar, la concentración final de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm con un espectrómetro UV NANODROP. Se evaluó la pureza de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Ejemplo 6: Creación de un ensayo indicador sensible a TREM-1

La línea celular indicadora de TREM-1 se generó transfectando la línea celular BWZ.36 con una construcción indicadora NFAT-LacZ, así como hTREM-1 y DAP12 (como se describe en el Ejemplo 1). Se purificaron neutrófilos de donantes sanos por medio de sedimentación de Dextrano. La sangre se estratificó en gradiente de FicollPaque (17-0840-03, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.) con una tasa de 3 partes de Ficoll y 4 partes de sangre en un tubo de 50 ml, después se centrifugó a 400xg durante 30 minutos a 22 °C, sin freno. La banda de PBMC intermedia se retiró suavemente por aspiración. Los neutrófilos estratificados en los RBC empaquetados se aspiraron y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml. Los neutrófilos y RBC contaminantes se diluyeron a 40 ml con PBS 1x y se siguieron de la adición de 10 ml de DEXTRANO 500 4 % (Sigma, 31392, St Louis, MO, EE.UU.) en solución de PBS. Después de mezclar por inversión suave, los tubos se dejaron a 22 °C durante 20-30 minutos. Después se transfirió un sobrenadante rico en granulocitos a un tubo nuevo y se centrifugó a 250 x g, durante 5 minutos, 22 °C; el sobrenadante se aspiró y se descartó. Se retiraron los RBC contaminantes con una lisis osmótica, brevemente, el sedimento celular se resuspendió en 7,5 ml de NaCl 0,2 %; se mezcló suavemente durante 55-60 segundos y se añadieron 17,5 ml de una solución de NaCl 1,2 %. El volumen se llevó después a 50 ml con PBS y se centrifugó a 250 x g durante 5 minutos, el sedimento se resuspendió en 7,5 ml de NaCl 0,2 % para repetir la lisis una segunda vez. El sedimento de granulocitos final se resuspendió en RPMI/FBS 10 %. Estos neutrófilos se estimularon con PGN (Invivogen, tlr-pgnsa, San Diego, CA, EE.UU.) durante una noche para generar neutrófilos activados capaces de estimular TREM-1. Las células indicadoras BWZ/hTREM-1 se añadieron después a los cultivos de neutrófilos activados por PGN en una relación 1:3 de célula indicadora:neutrófilos. En lugar de neutrófilos activados, podría usarse un complejo de ligando de TREM-1 que consiste en PGLYRP1 (SEQ ID NO: 23) y PGN para estimular TREM-1. El ensayo se procesó en placas de cultivo celular Negras recubiertas con Poli-D-Lisina (n.º 356640 de BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). La activación de TREM-1 se leyó después de 24 horas de cultivo usando el reactivo BetaGlo (E4720 de Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se midió la luminiscencia usando un contador de Luminiscencia TopCount de Perkin Elmer. Podría activarse un TREM-1 de control positivo por un anticuerpo de TREM-1 unido a placa (R&D MAB1278, Mineápolis, MN, EE.UU.) capaz de actuar como agonista de TREM-1. Las placas se recubrieron con control de isotipo o anticuerpo de TREM-1 MAB1278 (3 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo) en la nevera durante una noche o durante 2 horas a 37 °C, CO₂ 5 % antes de añadirse las células indicadoras BWZ/hTREM-1. Después de 6-24 horas de incubación la activación de TREM-1 pudo leerse usando el reactivo BetaGlo (E4720 de Promega, Madison, WI, EE.UU.) y medirse la luminiscencia usando un contador de luminiscencia TopCount de Perkin Elmer. Esta línea celular BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ (la "célula indicadora BWZ/hTREM-1") mostró ser altamente sensible a reticulación mediada por anticuerpos de TREM-1, proporcionando una inducción de ~40 veces de la producción de LacZ conducida por NFAT cuando se estimuló con 1-10 µg/ml de anticuerpo anti TREM-1 disponible en el mercado unido a placa, en comparación con el control de isotipo (Figura 1). Cuando se estimuló con un cóctel de receptor de tipo toll (tlr-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich Dinamarca) solo (BWZ+TLR) no se observó ningún aumento de la señal. Además, los neutrófilos inactivados no pudieron estimular TREM-1, mientras que los neutrófilos activados por cóctel agonista de TLR (tlr-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich Dinamarca) pudieron estimular la célula indicadora BWZ/hTREM-1.

La Tabla 1, a continuación, muestra que los anticuerpos de TREM-1 desvelados en el presente documento son capaces de bloquear la activación de TREM-1 inducida por ligando en dicho ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1.

Tabla 1

Anticuerpo	Luminiscencia x10E6
BWZ+neutrófilos activados	8,8
MAB1278	10

Anticuerpo	Luminiscencia x10E6
HPA	7,9
TREM26	9,9
TREM37	6.1
14F128	0,3
14F69	0,4
14F116	0,7
14F11	0,4
14F113	0,3

Ninguno de los anticuerpos disponibles en el mercado ensayados: MAB1278 (cat. n.º MAB1278, R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, EE.UU.), anti TREM-1 HPA (cat. n.º HPA005563, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), TREM26 (cat. n.º 314902, Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.) y TREM37 (cat. n.º 316102, Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.) fueron capaces de bloquear la señal de TREM-1.

Ejemplo 7: Mapeo de epítomos usando HX-MS

Materiales

Los lotes de proteínas usados fueron:

hTREM-1: TREM-1 recombinante humano, no glucosilado, producido en *E. coli*. (cat. n.º PRO-457, ProSpecTany TechnoGene Ltd., Rehovot, Israel).

Tabla 2: mAb usados

Anticuerpo	Proveedor
mAb 0023	-
mAb 0024	-
mAb 0025	-
mAb 0026	-
MAB 1278	RnD Systems
TREM26	BioLegend

Se intercambió el tampón de todas las proteínas a PBS a pH 7,4 antes de los experimentos.

Métodos: experimentos de HX-MS

Instrumentación y registro de datos

Los experimentos de HX se automatizaron por un robot Leap (H/D-x PAL, Leap Technologies Inc.) operado por el software LeapShell (Leap Technologies Inc.), que realizó inicio de la reacción de intercambio de deuterio, control del tiempo de reacción, reacción de interrupción, inyección en el sistema de UPLC y control del tiempo de digestión. El robot Leap se equipó con dos pilas de temperatura controlada mantenidas a 20 °C para almacenamiento de tampón y reacciones de HX y se mantuvieron a 2 °C para almacenamiento de proteína y solución de interrupción, respectivamente. El robot Leap contenía además una unidad Trio VS enfriada (Leap Technologies Inc.) que mantenía las precolumnas y las columnas analíticas así como la columna de pepsina, el tubo de LC y válvulas de conmutación a 1 °C. Las válvulas de conmutación de la unidad Trio VS se han actualizado de HPLC a válvulas de conmutación de UHPLC Microbore (Cheminert, VICI AG). Para la digestión con pepsina en línea, se cargaron 100 µl de muestra interrumpida que contenía 200 pmoles de hTREM-1 y se pasó sobre el Cartucho de Pepsina Inmovilizado Poroszyme® (2,1 x 30 mm (Applied Biosystems)) usando un caudal isocrático de 200 µl/min (ácido fórmico 0,1 %:CH₃CN 95:5). Los péptidos resultantes se inmovilizaron y se desalaron en una precolumna VanGuard BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 5 mm (Waters Inc.)). Posteriormente, las válvulas se cambiaron para colocar la precolumna en línea con la columna analítica, UPLC-BEH C18 1,7 mm (2,1 x 100 mm (Waters Inc.)), y los péptidos se separaron usando un gradiente de 9 minutos de B 15-35 % suministrado a 200 µl/minuto de un sistema AQUITY

UPLC (Waters Inc.). Las fases móviles consistieron en A: ácido fórmico 0,1 % y B: ácido fórmico 0,1 % en CH₃CN. Los datos de ESI MS y las adquisiciones de MS/MS dependientes de datos separados (CID) y experimentos de energía elevada (MS^E) se adquirieron en modo iónico positivo usando una EM Premier Q-TOF (Waters Inc.). Se usó leucina-enkefalina como la masa fija (ion [M+H]⁺ a *m/z* 556,2771) y se recogieron datos en modo continuo (para una descripción adicional de la preparación, véase Andersen y Faber, *Int. J. Mass Spec.*, 302, 139-148 (2011)).

Análisis de datos

Se identificaron péptidos pépticos en experimentos por separado usando métodos de CID MS/MS o MS^E convencionales (Waters Inc.). Los datos de MS^E se procesaron usando BiopharmaLynx 1.2 (versión 017). La adquisición de MS/MS dependiente de datos de CID se analizó usando el software MassLynx y la base de datos MASCOT interna.

Los archivos de datos sin procesar de HX-MS se sometieron a corrección de masa fija continua. Se realizaron análisis de datos, es decir, determinación de centroides de péptidos con deuterio y representación de curvas en intercambio, usando software personalizado prototipo (HDX browser, Waters Inc.) y HX-Express ((Versión Beta); Weis *et al.* *Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1700 (2006)). Todos los datos se evaluaron también visualmente para asegurar que solamente las envolturas isotópicas peptídicas resueltas se sometían al análisis.

Experimento de mapeo de epítomos

Se inició un intercambio de deuterio/hidrógeno de amida (HX) por una dilución de 6-8 veces de hTREM-1 en presencia o ausencia de mAb en el tampón con deuterio correspondiente (es decir PBS preparado en D₂O, D₂O final 96 %, pH 7,4 (valor no corregido)). Todas las reacciones de HX se llevaron a cabo a 20 °C y contenían hTREM-1 4 µM en ausencia o presencia de mAb 4 µM proporcionando por lo tanto un exceso molar de 2 veces de los sitios de unión a mAb. A intervalos temporales apropiados que variaron de 10 segundos a 10.000 segundos, se interrumpieron alícuotas de 50 µl de la reacción HX por 50 µl de tampón de interrupción helado (TCEP 1,35 M) dando como resultado un pH final de 2,5 (valor no corregido).

Resultados y análisis

Este experimento mapea los epítomos de mAb 0023, 0024, 0025, 0026 y los mAb comerciales MAB1278 (RnD Systems) y Clon 26 (Biolegend) en hTREM-1. El ciclo temporal de HX de 43 péptidos, que abarcaba el 94 % de la secuencia primaria de hTREM-1, se supervisó en ausencia o presencia de los ocho mAb diferentes durante 10 a 10000 segundos.

La protección de intercambio observada en los puntos temporales tempranos, por ejemplo <300 segundos, está relacionada con protones de amidas expuestos en superficie y por lo tanto también está relacionada con interfaces de proteínas. Por el contrario, los efectos observados de forma tardía en el ciclo temporal están relacionados con hidrógenos de amida de intercambio lento y por lo tanto están relacionados con el núcleo estructural de la proteína. Por lo tanto, los efectos epitópicos aparecen en los puntos temporales tempranos mientras que los efectos de estabilización estructural se manifestarán como reducción de intercambio en puntos temporales tardíos (García, Pantazatos y Villareal, *Assay and Drug Dev. Tech.* 2, 81 (2004); Mandell, Falick y Komives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14705 (1998)).

El patrón de intercambio observado en los puntos temporales tempranos en presencia o ausencia de un mAb dado puede dividirse en dos grupos diferentes: un grupo de péptidos presentan un patrón de intercambio que no está afectado por la unión a mAb. Por el contrario, otro grupo de péptidos en hTREM-1 muestran protección del intercambio tras la unión a mAb. Por ejemplo a los 100 segundos de intercambio con D₂O se protegen aproximadamente 2 amidas del intercambio en la región Y111-F126 de mAb 0023. Las regiones que presentan dichos efectos de protección se asignan a la región epitópica.

Mapeo de epítomos de mAb 0023 y 0026

MAB 0023 y 0026 inducen ambas alteraciones idénticas en el perfil de intercambio de hTREM-1 y se describirán juntos en el presente documento. Las regiones que presentan protección tras unión a 0023/0026 incluyen péptidos que abarcan los restos T22-L96 e Y111-D127. Sin embargo, comparando las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido tras la unión a mAb 0023/0026 y la falta de efectos epitópicos en los péptidos T25-F48, R84-Q112 y péptidos que comienzan en P118, el epítipo puede restringirse a los restos A21-E26, A49-I85 y C113-P119. Aunque están distantes en la secuencia, estas regiones están cerca en la estructura tridimensional de hTREM-1.

Mapeo de epítomos de mAb 0024 y Clon 26 de Biolegend

Tanto el mAb 0024 como el Clon 26 de Biolegend inducen alteraciones idénticas en el perfil de intercambio de hTREM-1 y se describirán juntos en el presente documento. Las regiones que presentan protección tras la unión a

mAb 0024 incluyen péptidos que abarcan los restos V101-Q112. Comparando las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido tras la unión a mAb 0024 y la falta de efectos epitópicos en péptidos circundantes, el epítipo puede restringirse a los restos Q104-Q112 (Figura 7B).

5 *Mapeo de epítipos de mAb 0025 en NNC*

Las regiones que presentan protección tras unión a 0025 incluyen péptidos que abarcan los restos D38-M63, T70-L96 y Y111-D127 (Figura 7C). Sin embargo, comparando las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido tras la unión a 0254-0025 y la falta de efectos epitópicos en péptidos en regiones circundantes, el epítipo puede restringirse a los restos V39-Q56, T70-I85 y C113-P119. Aunque están distantes en la secuencia, estas regiones están cerca en la estructura tridimensional de hTREM-1 (Figura 8).

Mapeo de epítipos de MAB1278

Las regiones que presentan protección tras unión a MAB1278 incluyen péptidos que abarcan los restos T70-L96 y V101-Q112 (Figura 7D). Sin embargo, comparando las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido tras la unión a MAB1278 y la falta de efectos epitópicos en péptidos en regiones circundantes, el epítipo puede restringirse a los restos T70-I85 y Q104-Q112. Aunque están distantes en su secuencia, estas regiones están cerca en la estructura tridimensional de hTREM-1.

La posición estructural de los epítipos de mAb 0023/0026 y mAb 0025 se muestran en la Figura 7A. El epítipo de los mAb 0023 y 0026 parece residir principalmente en láminas β en la interfaz dimerica del dímero de estructura cristalina de hTREM-1. El antagonismo de estos mAb podría ser el resultado de la prevención de la dimerización de hTREM-1 y por lo tanto la señalización.

Ejemplo 8: determinación de la interfaz de interacción entre TREM-1 y mAb 0170

Los epítipos se mapearon en TREM-1 tanto recombinante humano como de cynomolgus (hTREM-1 y cTREM-1, respectivamente). La construcción de hTREM-1 usada en este ejemplo comprende los restos M1-H140 (SEQ ID NO: 18) y la construcción de cTREM-1 comprende los restos M1-R180 de (SEQ ID NO: 12) con seis restos de histidina añadidos al extremo C terminal y usando la numeración de aminoácidos de hTREM-1 de tipo silvestre. A lo largo de este ejemplo los aminoácidos de cTREM-1 se numeran de acuerdo con el resto análogo en hTREM-1, como se ilustra en la Figura 11. La numeración usada en este ejemplo puede convertirse a la numeración en SEQ ID NO: 12 restando 19 si el número de resto es 58 o menos y restando 20 si el número de resto es 60 o más. Como ejemplo, el número de resto E46 en cTREM-1 en este ejemplo corresponde al resto (46 - 19 = 27) E27 en SEQ ID NO: 12. El número de resto en L96 en cTREM-1 en este ejemplo corresponde al resto (96 - 20 = 76) L76 en SEQ ID NO: 12.

Se diluyeron soluciones de TREM-1, solo o en presencia de mAb 0170, 25 veces en tampón hepes con deuterio al 97 % (hepes 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 7,4). Se prepararon controles sin deuterio diluyendo en tampón de hepes protonado. Los experimentos de intercambio de hidrógeno se realizaron en un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento HDX nanoAcquity Waters (UPLC) (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) que incluía el automuestreador de HD-x PAL (LEAP Technologies Inc., Carrboro, NC, EE.UU.) para la preparación de muestras automática. Los tubos de LC, precolumna y columna analítica y válvulas de conmutación se localizaron en una cámara enfriada a 0,3 °C. La columna de digestión con tripsina se almacenó a 15 °C. Se realizaron reacciones de intercambio de hidrógeno a 20 °C. Se realizó análisis de masas en línea usando un espectrómetro de masas SYNAPT G2 HDMS Waters.

Se diluyó un volumen que contenía 100 pmoles de TREM-1 humano o de cynomolgus (1,54-1,98 μ l) con o sin 120 pmol de mAb 0170 en tampón de hepes con deuterio hasta un volumen final de 50 μ l. En los intervalos temporales apropiados el volumen completo se transfirió a y se interrumpió en 50 μ l de Tris(2-carboxietil)fosfina 1,35 mM ajustada a pH 2,4 y se mantuvo a 3 °C. Se inyectaron inmediatamente 99 μ l de la solución interrumpida y se pasó sobre una columna de pepsina inmovilizada Porozyme (2,1 mm x 30 mm) (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se inmovilizó en una columna VanGuard BEH C18 Waters de 1,7 μ m (2,1 mm x 5 mm) a 100 μ l/min de caudal usando un metanol 5 % (vol/vol) y fase móvil de ácido fórmico 0,1 %. Los péptidos se separaron en una columna UPLC BEH C18 Waters de 1,7 μ m (1,0 mm x 100 mm) usando un gradiente de acetonitrilo de 10 - 40 % que contenía ácido fórmico 0,1 % a un caudal de 40 μ l/minuto.

El espectrómetro de masas se operó en modo iónico positivo con separación de movilidad iónica activada. Las condiciones de electropulverización fueron de 3,2 kV capilar, 25 V de cono de muestra y 4 V de compensación de cono de extracción, 850 ml/minuto de caudal de gas de desolvatación de nitrógeno calentado a 350 °C y 50 ml/min de flujo de gas de cono. El bloque fuente se calentó a 120 °C. Se adquirieron datos de corrección de masa fija usando el ion 1+ de Leucina-encefalina (m/z 556,2771) como compuesto de referencia y se aplicó durante análisis de datos. Para identificación de péptidos se realizaron experimentos de tipo MS^E usando compensaciones de colisión de trampa de 6 V (baja energía) y 50 V (energía elevada). Se analizaron muestras con deuterio usando solamente la compensación de colisión de trampa de baja energía de 6 V. Para más detalles véase Andersen, M. D., Faber, J. H., Int. J. Mass Spectrom. (2011), 302, 139 - 148.

Los datos de MS^E se analizaron usando ProteinLynx Global Server 2.5 de Waters y se identificaron péptidos de hTREM-1 que abarcaban 80 % de la secuencia proteica (Tabla 3) y se identificaron péptidos de cTREM-1 que abarcaban el 100 % de la secuencia proteica (Tabla 4). Los archivos de datos de HX-MS se analizaron usando DynamX 1.0 de Waters que aplica automáticamente corrección de masa fija y determina el grado de incorporación de deuterio en cada péptido. Además, todos los datos se inspeccionaron manualmente para asegurar la asignación de pico correcta y el cálculo de la incorporación de deuterio.

Resultados

- 10 Se proporcionó una lista de los péptidos y sus patrones de intercambio en la Tabla 3.

15 Cuando mAb 0170 se unió con hTREM-1, se observó protección del intercambio en los péptidos que abarcaban la secuencia de A21 a L96 y se determinó posteriormente que el epítipo estaba en esta región. Cuando se tuvieron en cuenta péptidos que no mostraban ninguna protección del intercambio tras la unión de mAb 0170, el epítipo pudo restringirse a regiones D38-F48. La región de R84-L96 mostró de poco a ningún intercambio en presencia o ausencia de mAb 0170 y no fue posible concluir si esta región era parte del epítipo de unión a mAb 0170. El péptido K47-A68 no mostró protección del intercambio tras la unión de mAb 0170, pero el péptido T44-C69 se protegió cuando estaba unido a mAb 0170. Los primeros dos restos de un péptido se retrointercambian rápidamente y se pierde la información de intercambio de esos restos. Se concluyó que al menos uno de los restos E46, K47 y F48 era importante para la unión de mAb 0170.

Tabla 3: resultados del mapeo de epítipos por HXMS de mAb 0170 en TREM-1 humano

Péptido	mAb 0170
A21-L37	N
A21-D38	N
A21-V39	N
A21-C69	EX
T22-D38	N
D38-Q56	EX
D38-M63	EX
D38-L67	EX
D38-A68	EX
D38-C69	EX
V39-A68	EX
V39-C69	EX
D42-C69	EX
T44-C69	EX
K47-A68	N
A49-C69	N
I57-A68	N
I57-C69	N
I57-L87	N
L67-L87	N
A68-E88	N
A68-L96	N
C69-L87	N
C69-L96	N

Péptido	mAb 0170
T70-L87	N
T70-E88	N
T70-L96	N
R84-L96	LE
E88-L96	LE
Q104-L110	N
Y111-M124	N
Y111-F126	N
Y111-D127	N
C113-F126	N
V114-F126	N
V114-D127	N
I115-F126	N
I115-D127	N
EX: región epitópica indicada por protección de intercambio de hidrógeno tras la unión a anticuerpo (diferencia de intercambio (EX)>0,8 deuterones)	
W: intercambio débil debido a efectos estructurales (0,1 <EX <0,8).	
N: sin protección del intercambio tras la unión a anticuerpo. (EX <0,1)	
LE: intercambio intrínseco bajo.	

Epítipo de mAb 0170 en cTREM-1

Se proporciona una lista de los péptidos y sus patrones de intercambio en la Tabla 4.

Quando mAb 0170 se unió con cTREM-1, se observó protección del intercambio en péptidos que abarcaban la secuencia de E38 a A68 y se determinó posteriormente que el epítipo estaba dentro de esta región. Cuando se tienen en cuenta péptidos que no muestran ninguna protección del intercambio tras la unión de mAb 0170, el epítipo podría restringirse a las regiones E38-L45. Este epítipo se correspondió bien con el epítipo de mAb 0170 en hTREM-1 pero estaba truncado en tres restos. El péptido C44-T69 en hTREM-1 se protegió tras la unión de mAb 0170, pero los péptidos A44-L67 y A44-A68 que abarcan la secuencia correspondiente en cTREM-1 no estaban protegidos. Por lo tanto, mientras que al menos uno de los restos E46, K47 y F48 en hTREM-1 contribuyeron al epítipo de unión los restos correspondientes E46, K47 e Y48 no estaban implicados en la unión de mAb 0170 a cTREM-1.

Tabla 4: mapeo de epítipos por HXMS de mAb 0170 en TREM-1 de cynomolgus

Péptido	mAb 0170
T21-L37	W
L24-L37	W
T25-L37	W
T25-E38	W
E38-L67	EX
E38-A68	EX
V39-L67	EX
V39-A68	EX
K40-L67	EX
A44-L67	W
A44-A68	W
E46-L67	N
K47-L67	N
A68-L87	W
A68-L96	W
A68-Q97	W
K69-L87	W

Péptido	mAb 0170
K69-L96	W
V82-L96	W
E88-L96	LE
E88-Q97	LE
Q97-L103	N
Q104-L110	N
Y111-C130	W
Y111-L131	W
V114-L131	W
I115-C130	W
I115-L131	W
L131-T180	W
L131-V182	W
V132-T180	W
V132-V182	W
Y152-T180	W
V181-E189	N
V181-H206	W
I190-H206	N
T193-H206	N
V195-H206	N
T196-H206	N
D197-H206	N
EX: Región epitópica indicada por protección de intercambio de hidrógeno tras la unión del anticuerpo. (Diferencia de intercambio (EX) > 0,8 deuterones)	
W: Intercambio débil debido a efectos estructurales (0,1 < EX < 0,8).	
N: Sin protección del intercambio tras la unión del anticuerpo. (EX < 0,1)	
LE: Intercambio intrínseco bajo	

Ejemplo 9: Estudio de cinética de interacción para anticuerpos anti TREM-1 con TREM-1 humano y de cynomolgus por resonancia de plasmón superficial (RPS)

- 5 Se realizaron estudios de unión en un analizador ProteOn (BioRad) que medía las interacciones moleculares en tiempo real a través de resonancia de plasmón superficial. 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 el ProteOn se corresponde directamente con la masa de las superficies de microplaca sensora individuales en seis celdas de flujo paralelas. Se inmovilizaron anticuerpo monoclonal anti Fc humano o policlonal anti Fc murino de kits
- 10 de captura de Fc humano o de ratón Biacore en dirección horizontal en celdas de flujo de una microplaca sensora GLM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inmovilización final del anticuerpo de captura fue de aproximadamente 2.600-6.000 UR en diferentes experimentos. Se realizó captura de anticuerpos anti-hTREM-1 expresados recombinantes o de ratón monoclonales purificados diluyendo los anticuerpos hasta 5-10 nM en tampón de ejecución (Hepes 10 mM NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, tensioactivo P20 0,05 %, pH 7,4) y se inyectaron en
- 15 dirección vertical a 30 µl/min durante 60 s, creando puntos intermedios de referencia adyacentes a todas las celdas de flujo con solamente el anticuerpo anti-Fc inmovilizado. Esto dio como resultado normalmente niveles de captura finales de anticuerpos de ensayo de aproximadamente 100-300 UR y valores de R_{máx} de analito de 30-90 UR. Se realizó unión de proteínas hTREM-1 o cTREM-1 por inyección del analito (antígeno) sobre todas las celdas de flujo en dirección horizontal para permitir análisis comparativos de la unión a diferentes anticuerpos anti-TREM-1
- 20 capturados en relación con la unión a el 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 ejecución, se inyectaron a 100 µl/min durante 250 s y se permitió que se disociaran durante 600 s. La superficie de 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 µl/min. Esta etapa de regeneración retiró el anticuerpo anti-TREM-1 y cualquier proteína TREM-1 unida de la superficie a anticuerpo de
- 25 captura inmovilizado, y permitió la unión posterior del siguiente par de muestras de interacción. El procedimiento de regeneración no retiró el anticuerpo de captura anti-Fc inmovilizado directamente de la superficie de la microplaca.

Se cuantificó la afinidad de unión entre anticuerpos y el antígeno por determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_D) determinada por la medición de la cinética de la formación y disociación de complejos. Las

30 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 a modelo de Langmuir 1:1 usando el software de evaluación ProteOn para análisis de datos. K_D está relacionada con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d / k_a$. Las curvas de unión se procesaron por referencia doble (resta de las señales de superficie de referencia así como inyecciones de tampón en blanco sobre anticuerpos anti-TREM-1 capturados) antes del análisis

35 de datos. Esto permitió la corrección del ruido instrumental, desplazamiento de volumen y deriva durante las inyecciones de muestras.

Tabla 5: Resultados de mediciones de las constantes de unión k_a (velocidad de asociación), k_d (velocidad de disociación) y KD (constante de disociación en equilibrio) para la interacción de TREM-1 humano con diferentes anticuerpos monoclonales anti-TREM-1.

mAb	Clon	Origen	k_a (1/(Ms))	k_d (1/s)	KD (M)
mAb 0023	5F8A1	Hibridoma	1,0E+05	2,2E-04	2,1E-09
mAb 0024	5F28A1	Hibridoma	7,8E+04	3,6E-04	4,6E-09
mAb 0025	5F19A1	Hibridoma	8,8E+05	8,5E-04	9,7E-10
mAb 0026	5F27A1	Hibridoma	6,2E+04	9,7E-05	1,5E-09
mAb 0030	5F17A1B2	Hibridoma	1,2E+05	4,2E-04	3,6E-09
mAb 0031	13F6A1	Hibridoma	1,2E+06	3,7E-03	3,1E-09
mAb 0032	13F10A1	Hibridoma	1, 1E+06	2,1E-03	1,9E-09
mAb 0033	9F11A1	Hibridoma	7,8E+04	1,1E-03	1,5E-08
mAb 0034	14F17A1	Hibridoma	1,9E+05	1,9E-04	1,0E-09
mAb 0039	5F8A1 en mlgG2aa	Recombinante	8,9E+04	1,6E-04	1,8E-09
mAb 0040	5F8A1 en mlgG1	Recombinante	9,3E+04	2,0E-04	2,2E-09
mAb 0041	5F27 en mlgG2aa	Recombinante	7,9E+04	1,8E-04	2,3E-09
mAb 0042	5F27A1 en mlgG1	Recombinante	8,5E+04	2,5E-04	2,9E-09
mAb 0044	14F69A1	Hibridoma	1,5E+06	2,9E-04	2,0E-10
mAb 0045	13F14A1	Hibridoma	1,3E+06	3,2E-03	2,5E-09
mAb 0046	14F70A1	Hibridoma	9,3E+05	1,9E-04	2,1E-10
mAb 0048	14F11A1B1	Hibridoma	1,7E+06	3,9E-03	2,4E-09
mAb 0049	14F86A1	Hibridoma	8,8E+05	1,3E-03	1,5E-09
mAb 0051	5F24 HC645/LC647	Recombinante	6,8E+05	3,0E-03	4,5E-09
mAb 0054	14F128A1	Hibridoma	1,6E+06	3,8E-03	2,4E-09
mAb 0059	14F113/14F69	Recombinante	1,7E+06	5,2E-04	3,2E-10
mAb 0063	14F116A1B1	Hibridoma	1,0E+06	1,4E-03	1,4E-09
mAb 0064	14F20A1B1	Hibridoma	8,9E+05	1,3E-03	1,5E-09
mAb 0067	14F11A1B1	Recombinante	2,2E+06	3,9E-03	2,0E-09
mAb 0068	14F128/14F11	Recombinante	2,7E+06	3,9E-03	1,7E-09
mAb 0070	14F113/14F69	Recombinante	2,1E+06	4,3E-04	2,5E-10
mAb 0078	14F106A2	Hibridoma	9,8E+05	1,4E-03	1,5E-09
mAb 0079	14F29A1B1	Hibridoma	2,6E+05	1,2E-03	4,6E-09
mAb 0080	14F17A1B1	Hibridoma	2,7E+05	1,9E-04	7,1 E-10
mAb 0083	14F116A1B1	Recombinante	1,0E+06	1,7E-03	1,7E-09
mAb 0090	14F113 completamente humanizado	Recombinante	2,1E+06	1,5E-03	7,7E-10
mAb 0115	14F113HC/14F128LC mezclado y humanizado	Recombinante	1,8E+06	2,4E-02	1,6E-08
mAb 0120	14F113/14F69 hz variante HC A78L	Recombinante	2,2E+06	1,5E-03	6,7E-10
mAb 0121	14F113/14F69 hz variante HC T93V	Recombinante	2,8E+06	1,7E-03	6,3E-10
mAb 0122	14F113/14F69 hz variante LC M4L	Recombinante	2,5E+06	1,4E-03	6,0E-10
mAb 0124	14F113/14F69 hz variante LC G68R	Recombinante	2,0E+06	1,2E-03	6,1 E-10
mAb 0170	14F113/14F69 hz variante LC Q98I	Recombinante	2,9E+06	5,4E-04	1,9E-10

5 *Tabla 6: Resultados de las mediciones de constantes de unión k_a (velocidad de asociación), k_d (velocidad de disociación) y KD (constante de disociación en equilibrio) para la interacción de TREM-1 de cynomolgus con diferentes anticuerpos monoclonales anti-TREM-1.*

mAb	Clon	Origen	k_a (1/(Ms))	k_d (1/s)	KD (M)
mAb 0048	14F11A1B1	Hibridoma	1,4E+05	1,7E-04	1,2E-09
mAb 0059	14F113A1B1C1	Recombinante	1,8E+05	1,2E-04	6,7E-10
mAb 0067	14F11A1B1	Recombinante	3,8E+05	1,7E-03	4,7E-09
mAb 0068	14F128/14F11	Recombinante	2,8E+05	3,4E-03	1,2E-08
mAb 0083	14F116A1B1	Recombinante	Sin unión	Sin unión	Sin unión
mAb 0090	14F113 completamente humanizado	Recombinante	1,4E+05	3,0E-04	2,1E-09
mAb 0121	14F113 hz variante HC T93V	Recombinante	1,3E+05	1,3E-04	9,4E-10
mAb 0122	14F113 hz variante LC M4L	Recombinante	1,7E+05	1,6E-04	9,7E-10
mAb 0124	14F113 hz variante LC G68R	Recombinante	1,7E+05	2,0E-04	1,1E-09
mAb 0170	14F113 hz variante LC Q98I	Recombinante	2,5E+05	8,9E-04	3,6E-09

Ejemplo 10: Humanización del mAb de bloqueo de TREM-1 14F69.

10

Las regiones variables de dos anticuerpos candidatos se obtuvieron a partir de la clonación de los hibridomas 14F128A1 y 14F113A1B1C1. Ambos anticuerpos se clonaron usando la técnica SMARTER-RACE (Clontech). Se realizó un intento de humanización como un bucle por iteraciones en el que los anticuerpos con injertos de CDR se evaluaron en primer lugar por afinidad y después se remodelaron técnicamente para incluir más retromutaciones

hasta que se conservó una afinidad aceptable, usando anticuerpos purificados de hibridoma como un punto de referencia. Los anticuerpos con injertos de CDR se diseñaron por ordenador y se solicitaron de un proveedor comercial (www.genscript.com). La posterior remodificación técnica de los anticuerpos se realizó usando mutagénesis dirigida (Stratagene). Todos los anticuerpos se expresaron en células HEK293-6E en preparación del ensayo de afinidad. A continuación hay una descripción de las consideraciones principales para la selección de línea germinal humana apropiada y ensayo de retromutaciones. Toda la numeración de regiones variables usada en este ejemplo se refiere al esquema de numeración de Kabat.

>m14F128A1_H (CDR marcadas en negrita y subrayado) (SEQ ID NO 8)

>m14F128A1_L (CDR marcadas en negrita) (SEQ ID NO 9)

>m14F113A1B1C1_H (CDR marcadas en negrita) (SEQ ID NO 10)

>m14F113A1B1C1_L (CDR marcadas en negrita) (SEQ ID NO 11)

A partir de un análisis de las secuencias, las CDR para m14F128A1 de acuerdo con la definición de Kabat son:

>CDR_H1

TYAMH

>CDR_H2

RIRTKS[N/S]NYATYY[V/A]DSVKD

>CDR_H3

DMG[I/A]RRQFAY

>CDR_L1

RASESVD[S/T]F[G/D] [I/Y]SF[M/L]H

>CDR_L2

RASNLES

>CDR_L3

QQSNEDPYT

Con las diferencias entre m14F128A1 y m14F113A1B1C1 proporcionadas como [m14F128A1/m14F113A1B1C1].

Se construyó un modelo tridimensional de m14F128A1 usando técnicas convencionales en MOE [disponible de www.chemcomp.com] y todos los restos a una distancia de 4,5 Å de las regiones CDR efectivas (VH: 31-35B, 50-58, 95-102; VL: 24-34, 50-56, 89-97) se definieron como restos de enmascaramiento. Los restos de enmascaramiento son todos potencialmente importantes para mantener la unión en las CDR.

Los restos de enmascaramiento incluyeron las posiciones 1-2, 4, 27-37, 47, 49-59, 69, 71, 73, 78, 92-103 para la cadena pesada y las posiciones 1-5, 7, 23-36, 46, 48-56, 58, 62, 67-71, 88-98 para la cadena ligera.

Usando búsquedas de línea germinal de m14F128A1 e inspección manual, se identificaron VH3_73 y JH4 como una combinación de línea germinal humana apropiada para la cadena pesada y VKIV_B3 y JK2 se identificaron como la combinación de línea germinal humana apropiada para la cadena ligera.

>VH3_13/JH4

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYATAYA

ASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR/YFDYWGQGTLLTVSS

>VKIV_B3/JK2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP

DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTP/YTFGQGTKLEIKR

Después se realizó humanización con las siguientes normas:

- Los restos fuera de la máscara se tomaron como humanos.
- Los restos dentro de la máscara y dentro de la CDR de Kabat se tomaron como murinos.
- Los restos dentro de la máscara y fuera de la CDR de Kabat con consenso de línea germinal/ratón se tomaron como la secuencia consenso.
- Los restos dentro de la máscara y fuera de la CDR de Kabat con diferencia de línea germinal/ratón se sometieron a retromutaciones potenciales.

El injerto de las regiones CDR efectivas de m14F128A1 en las líneas germinales formó la construcción de humanización básica de m14F128A1, hz14F128A1.

>hz14F128A1_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS**TYAMH**WVRQASGKGLEWVG**RIRTKSN**NYATYYA
ASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR**DMGIR**RQFAYWGQGLTVTVSS

>hz14F128A1_L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDSFGISFMH**WYQQKPGQPPKLLIY**RASNLES**GVPD
 RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC**QQSNEDPYT**FGQGTKLEIK

5 >CDR_H1
 TYAMH
 >CDR_H2
 RIRTKSN**NYATYYAASVKGR**
 >CDR_H3
 DMGIR**RQFAY**
 >CDR_L1
 10 RASESVDSFGISFMH
 >CDR_L2
 RASNLES
 >CDR_L3
 QQSNEDPYT
 15

Las únicas diferencias en comparación con las CDR murinas fueron en CDR_H2 (mostrado en negrita). Cualquier discrepancia entre m14F128A1 y hz14F128A1 en un resto de enmascaramiento creará una retromutación potencial y la lista incluye:

20 hz14F128A1_H: S30N, G49A, A78L, V93T
 hz14F128A1_L: M4L, M58I, G68R

Además, la homología estrecha de m14F128A1 y m14F113A1 B1 C1 se usó para sugerir restos que podrían influir en la afinidad de hz14F128A1.

25 hz14F128A1_H: N53S, 198Q
 hz14F128A1_L: S27D_T, G29D, I30Y, M33L

30 Para investigar todos los mAAb humanizados potencialmente se produjeron y se ensayaron todas las combinaciones de los mutantes anteriores.

35 El anticuerpo anti hTREM1 humanizado final (mAAb 0170) derivado de hibridoma 14F113 contiene una retromutación de marco conservado LC (M4L) y una mutación CDR3 HC (Q98I). La mutación en CDR3 HC se introdujo basándose en un estudio de sinergia de afinidad con un anticuerpo altamente homólogo denominado 14F128. La justificación para incluir ambas mutaciones se describe a continuación.

Estudio de sinergia de afinidad de los anticuerpos 14F128 y 14F113

40 Los anticuerpos de hibridoma 14F128 y 14F113 son altamente homólogos y derivaron del mismo acontecimiento de recombinación somático. Los dos anticuerpos compiten por la unión a hTREM1 con 14F113 que tienen la mayor afinidad. En total las versiones con injertos de CDR de los dos anticuerpos difieren en sus composiciones de CDR en solamente seis aminoácidos (cuatro en CDR LC, y dos en CDR HC). Las seis mutaciones, cuando se compara 14F113 con 14F128 son LC T27aS, D29G, Y30I, L33M y HC S54N, Q98I. Aunque 14F128 con injertos de CDR tuvo una afinidad inferior a 14F113 con injertos de CDR se investigó si un efecto de afinidad beneficioso de una o más de
 45 las seis mutaciones se suprimía por el efecto general cuando las seis mutaciones estaban presentes. Las seis mutaciones (excepto HC S54N) se introdujeron por lo tanto individualmente en el anticuerpo 14F113 con injertos de CDR y los anticuerpos se clasificaron por afinidad. Dos mutaciones (LC L33M y HC Q98I) fueron individualmente capaces de mejorar la afinidad de 14F113 con injertos de CDR. Una mutación de la HC en la posición Q98I dio lugar a una afinidad particularmente buena del anticuerpo resultante (mAAb 0170).

Análisis de afinidad de retromutación de marco conservado

La versión de ratón del anticuerpo 14F113 tuvo siete mutaciones que eran potencialmente necesarias para incluir como retromutaciones durante la humanización. Las retromutaciones potenciales en la HC y LC fueron S30N, G49A,

A78L y T93V M4L, V58I, G68R, respectivamente. Las siete retromutaciones se introdujeron individualmente en 14F113 con injertos de CDR y después se clasificaron por afinidad. Aunque varias de las mutaciones fueron capaces de mejorar la afinidad, solamente la mutación M4L de CL se seleccionó para mAb 0170. La decisión de incluir mutaciones se equilibró frente a título de expresión (HEK293 6E), la afinidad y el número total de mutaciones.

5 **Ejemplo 11: Estudio de cinética de interacción para anticuerpos de TREM-1 con hTREM-1 por resonancia de plasmón superficial (RPS): comparación entre mAb 0170 y anticuerpos de TREM-1 disponibles en el mercado.**

10 Se realizaron estudios de unión en un analizador ProteOn (BioRad) que miden las interacciones moleculares en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial. Los experimentos se procesaron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 15 °C en el compartimento de muestras. La señal (UR, unidades de respuesta) presentada por el ProteOn se correlaciona directamente con la masa en las superficies de microplacas sensoras individuales en seis celdas de flujo paralelas. Los anticuerpos disponibles en el mercado incluidos fueron Biolegend n.º 314907, Biolegend n.º 316102 (Biolegend, EE.UU.), Hycult Biotech HM2252 (Hycult Biotech, Países Bajos), R&D n.º MAB1278 (R&D systems, Reino Unido), SC98Z12 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), Sigma n.º WH0054210m4, Sigma n.º SAB1405121 (Sigma-Aldrich Dinamarca A/S).

20 Se inmovilizaron anticuerpo monoclonal anti Fc humano o anticuerpo policlonal anti Fc murino de kits de captura de Fc humano o de ratón Biacore en dirección horizontal en celdas de flujo de una microplaca sensora GLM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inmovilización final de anticuerpo de captura fue de aproximadamente 2.600-6.000 UR en diferentes experimentos. Se realizó captura de anticuerpos anti hTREM-1 humanizados expresados recombinantes o de ratón monoclonales purificados diluyendo los anticuerpos a 5-10 nM en tampón de ejecución (Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, tensioactivo P20 0,05 %, pH 7,4) y se inyectaron en dirección vertical a 30 µl/min durante 60 s, creando puntos intermedios de referencia adyacentes a todas las celdas de flujo con solamente anticuerpo anti Fc inmovilizado. Esto dio como resultado normalmente niveles de captura finales de anticuerpos de ensayo de aproximadamente 100-300 UR y valores de R_{máx} de analito de 30-90 UR. Se realizó unión de proteínas hTREM-1 o cTREM-1 inyectando analitos sobre todas las celdas de flujo en dirección horizontal para permitir los análisis comparativos de unión a diferentes anticuerpos anti TREM-1 capturados en relación con unión a el punto intermedio de referencia. Las proteínas hTREM-1 o cTREM-1 se diluyeron en serie 1:3 hasta 1,2-100 nM o en tampón de ejecución, inyectado a 100 µl/min durante 210 s y se permitió que se disociaran durante 600 s. La superficie de GLM se regeneró después de cada ciclo de inyección de analito mediante dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 1,7 y NaOH 50 mM a 100 µl/min. Esta etapa de regeneración retiró el anticuerpo anti-TREM-1 y cualquier proteína TREM-1 unida de la superficie de anticuerpo de captura inmovilizado, y posibilitó la unión posterior del siguiente par de muestras de interacción. El procedimiento de regeneración no retiró el anticuerpo de captura anti-Fc inmovilizado directamente de la superficie de la microplaca.

40 La afinidad de unión entre anticuerpos y el antígeno se cuantificó por determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_D) determinada por medición de la cinética de formación de complejos y disociación. Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente tales como k_a (velocidad de asociación) y k_d (velocidad de disociación) se recuperaron por ajuste de datos a modelo de Langmuir 1:1 usando el software de evaluación ProteOn 3.1.0.6 para análisis de datos. K_D está relacionada con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

45 Las curvas de unión se procesaron por referencia doble (resta de señales de superficie de referencia así como inyecciones de tampón blancas sobre anticuerpos anti-TREM-1 capturados) antes del análisis de datos. Esto permitió la corrección con respecto al ruido instrumental, desplazamiento de volumen y deriva durante las inyecciones de muestras.

50 **Tabla 7: Resultados de mediciones de K_D (constante de disociación en equilibrio) para la interacción de TREM-1 humano y de cynomolgus con diferentes anticuerpos monoclonales anti-TREM-1.**

Anticuerpo	TREM-1 humano K_D (M)	TREM-1 de cyno K_D (M)
mAb 0170	2E-10	3E-09
Biolegend n.º 314907	9E-10	4E-09
Biolegend n.º 316102	8E-10	Sin unión
Hycult Biotech HM2252	3E-09	Sin unión
R&D n.º MAB1278	8E-09	Sin unión
SC98Z12	3E-08	Sin unión
Sigma n.º WH0054210m4	2E-08	Sin unión
Sigma n.º SAB1405121	Sin unión	Sin unión

Ejemplo 12: Estudios de unión competitiva de anticuerpos monoclonales anti TREM-1 humano por resonancia de plasmón superficial.

55 Se realizaron estudios de competición de unión de RPS a anticuerpos anti hTREM-1 humanizados expresados

recombinantes o de ratón monoclonales para diferenciar entre diferentes sitios de unión (epítomos). Fueron anticuerpos disponibles en el mercado incluidos Biolegend n.º 314907 (Biolegend, EE.UU.) y SC98Z12 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Los anticuerpos monoclonales anti hTREM-1 que compiten por el mismo sitio de unión o uno solapante (epítomo) en el antígeno no son capaces de unirse simultáneamente al antígeno y por lo tanto se les asigna al mismo "grupo". Los anticuerpos monoclonales anti TREM-1 que no compiten por el mismo sitio de unión o uno solapante en el antígeno son capaces de unirse simultáneamente y se asignan por lo tanto a diferentes "grupos". Se realizaron experimentos con dominio extracelular de TREM-1 humano, soluble, como antígeno.

Todos los estudios de procesaron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 15 °C en el compartimento de muestras. Se inmovilizaron anticuerpos monoclonales anti TREM-1 individuales y un anticuerpo monoclonal de control no relacionado en celdas de flujo separadas de una microplaca sensora de GLC usando una mezcla 1:1 de EDAC [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] 0,4 M y sulfo-NHS [N-hidroxisulfosuccinimida] 0,1 M. Cada anticuerpo se diluyó en acetato sódico 10 mM pH 5,0 hasta una concentración de 25 o 10 (SC98Z12 (80394)) µg/ml, y se inmovilizó en una celda de flujo individual a 30 µl/min durante 240 s. Los anticuerpos se inmovilizaron en celdas de flujo L1-L6 (incluyendo control). Después de inmovilización del anticuerpo, los sitios activos en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina 1 M. Se realizaron inmovilizaciones con activación y desactivación en una dirección horizontal creando puntos de referencia de puntos intermedios sin proteína inmovilizada. El nivel de inmovilización final de anticuerpos de ensayo varió de aproximadamente 1.100 a 1.300 UR en un experimento, excepto por un anticuerpo (SC98Z12) en el que solamente se inmovilizaron 390 UR. Se diluyó TREM-1 humana recombinante en 100 nM en tampón de ejecución (Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, tensioactivo P20 0,05 %, pH 7,4). El antígeno se inyectó sobre anticuerpos inmovilizados en dirección horizontal a 30 µl/min durante 300 s, permitiendo el control de unión no específica potencial tanto con referencias de puntos intermedios como anticuerpos de control inmovilizados dando como resultado 150-600 UR de TREM-1 capturado, excepto por un anticuerpo (SC98Z12) con nivel de inmovilización bajo en el que solamente se capturaron 4 UR.

Cada anticuerpo (los mismos que se habían inmovilizado) se inyectó sobre celdas de flujo paralelas en una dirección horizontal para permitir análisis comparativo de unión a hTREM-1 capturado por los anticuerpos primarios en relación con unión tanto a las referencias de puntos intermedios como con los anticuerpos de control inmovilizados. Cada anticuerpo en competición se diluyó hasta 100 nM y se inyectó a 100 µl/min durante 250 s. La microplaca de GLC se regeneró después de cada ciclo de inyección de analito mediante dos inyecciones de 18 s de ácido fórmico 1 M pH 3,5, MgCl₂ 3 M y NaOH 50 mM a 100 µl/min. Esta etapa de regeneración retiró el antígeno de TREM-1 y cualquier anticuerpo secundario unido de la superficie de anticuerpo inmovilizado, y permitió la unión posterior de la siguiente muestra de ensayo. El procedimiento de regeneración no retiró el anticuerpo de ensayo anti TREM-1 inmovilizado directamente (anticuerpo primario) de la superficie de la microplaca. Se realizó análisis de datos con el software ProteOn Manager™ 3.1.0.6. Se evaluaron los niveles de captura para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión uniforme por toda la secuencia de inyecciones. No se observó ninguna unión inespecífica significativa de TREM-1 humano ni con las superficies de control de puntos intermedios ni con el anticuerpo de control inmovilizado. Las curvas de unión se procesaron por resta de las señales de superficie de control de puntos intermedios. Esto permitió la corrección del ruido instrumental y el desplazamiento de volumen durante las inyecciones de muestras.

Los resultados de competición se presentaron como unión positiva o negativa (Tabla 8). La unión positiva (+) indica que el anticuerpo de competición fue capaz de unirse al hTREM-1 simultáneamente con el anticuerpo primario (es decir no compiten), y los anticuerpos primario y de competición se asignaron posteriormente a diferentes grupos de epítomos. La unión negativa indica que el anticuerpo de competición fue incapaz de unirse al hTREM-1 simultáneamente con el anticuerpo primario (es decir, si compiten), y los anticuerpos primario y de competición se asignaron por lo tanto al mismo grupo de epítomo. Los valores de respuesta en estos experimentos fueron significativos y permitieron una determinación inequívoca de grupos de epítomos de los anticuerpos monoclonales anti TREM-1.

Tabla 8: Capacidad para unirse (+) o competir (-) con anticuerpos ensayados en ensayo de competición de RPS. SC98Z12 no proporcionó captura suficientemente alta de TREM-1 para evaluar como anticuerpo primario ().*

Secundario	Primario			
	Biolegend n.º 314907	SC98Z12	mAb 0048	mAb 0170
Biolegend n.º 314907	-	*	+	+
SC98Z12	-	*	+	+
mAb 0048	+	*	-	-
mAb 0170	+	*	-	-

Se mostró que mAb 0170 y mAb 0048 (purificados del hibridoma 14F11, que es idéntico al 14F128) competían por la unión a TREM-1 humano. Biolegend n.º 314907 y SC98Z12 no compitieron con ninguno de estos por la unión de TREM-1 humano pero compitieron entre sí. Estos hallazgos concluyen que los primeros dos (mAb 0048 y mAb

0170) pertenecen al mismo grupo (grupo 1) mientras que Biolegend n.º 314907 y SC98Z12 pertenecen a otro grupo (grupo 2).

Ejemplo 13: Análisis cinético de la interacción entre la unión de Fab 0011 y Fab 0170 con versiones mutadas de TREM-1 humano y de cynomolgus

Se realizaron estudios de interacción por RPS para definir diferencias en los epítomos para anticuerpos anti TREM-1 humano 0011 y 0170 en TREM-1 humano. Comparando la cinética de unión a variantes de TREM-1 humano con mutaciones de alanina introducidas en epítomos conocidos, así como variantes parcialmente "humanizadas" de TREM-1 de cynomolgus, estas últimas ya que solamente mAAb 0170 reacciona de forma cruzada con TREM-1 de cynomolgus, se identificaron restos de aminoácidos únicos para epítomos respectivos.

Las construcciones mutantes de alanina de dominio extracelular de hTREM-1 y construcciones de mutantes de cynomolgus parcialmente humanizados usadas en este estudio se resumen en la Tabla 9. Todas las construcciones usadas fueron variantes de SEQ ID NO: 19 (variantes de TREM-1 de cynomolgus) o SEQ ID NO: 20 (variantes de TREM-1 humano) e incluyeron un marcador -cmv²-His⁶ C terminal para captura en ensayo de cinética de unión de RPS. A no ser que se indique de otro modo, las secuencias a las que se hace referencia en este ejemplo se numeran de acuerdo con la Figura 11.

Tabla 9

Variante de TREM-1	Proteína	Mutaciones
0221	mut 1 de Ala de TREM-1 humano	D38A
0222	mut 2 de Ala de TREM-1 humano	K40A
0223	mut 3 de Ala de TREM-1 humano	D42A
0224	mut 4 de Ala de TREM-1 humano	T44A
0225	mut 5 de Ala de TREM-1 humano	E46A
0226	mut 6 de Ala de TREM-1 humano	K47A
0227	mut 7 de Ala de TREM-1 humano	S50A
0228	mut 8 de Ala de TREM-1 humano	R84A
0229	mut 9 de Ala de TREM-1 humano	Y90A
0230	mut 10 de Ala de TREM-1 humano	H91A
0231	mut 11 de Ala de TREM-1 humano	D92A
0232	mut 12 de Ala de TREM-1 humano	H93A
0233	mut 13 de Ala de TREM-1 humano	R97A
0234	mut 14 de Ala de TREM-1 humano	R99A
0235	mut 15 de Ala de TREM-1 humano	D127A
0236	mut 16 de Ala de TREM-1 humano	R128A
0237	mut 17 de Ala de TREM-1 humano	R130A
0238	TREM-1 de cynomolgus wt	-
0239	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado"	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91H
0240	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 1"	A44A, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91H
0241	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 2"	A44T, Y48Y, N50S, R52Q, E75K, P91H
0242	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 3"	A44T, Y48F, N50N, R52Q, E75K, P91H
0243	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 4"	A44T, Y48F, N50S, R52R, E75K, P91H
0244 (SEQ ID NO: 14)	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 5"	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75E, P91H
0245 (SEQ ID NO: 15)	TREM-1 de cynomolgus "parcialmente humanizado con retromutación 6"	A44T, Y48F, N50S, R52Q, E75K, P91P
0247	TREM-1 humano wt	-

Se realizaron estudios de unión en un analizador ProteOn que mide las interacciones moleculares en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial. Los experimentos se procesaron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 15 °C en el compartimento de muestras. La señal (UR, unidades de respuesta) presentada por el ProteOn se correlaciona directamente con la masa en las superficies de microplacas sensoras individuales en seis celdas de flujo paralelas. Se inmovilizó anticuerpo monoclonal anti His en seis celdas de flujo paralelas de una microplaca sensora GLM usando una mezcla 1:1 de EDAC [clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] 0,4 M y sulfo-NHS [N-hidroxisulfosuccinimida] 0,1 M. El anticuerpo se diluyó en acetato sódico 10 mM pH 5,0 hasta una concentración de 25 µg/ml, y se inmovilizó en celdas de flujo individuales a 30 µl/min durante

240 s. Después de inmovilización del anticuerpo, los sitios activos en las celdas de flujo se bloquearon con etanolamina 1 M. La inmovilización se realizó con todas las etapas en dirección horizontal. El nivel de inmovilización final de anticuerpos de captura fue de aproximadamente 8.000 UR en un experimento. El medio de cultivo celular de células HEK 293 que expresaban el tipo silvestre o diferentes variantes mutadas de ECD de TREM-1 de cynomolgus se diluyó 40-60 veces en tampón de ejecución (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,05 %, pH 7,4). Se inyectaron proteínas TREM-1 sobre anticuerpo de captura anti His inmovilizado en la dirección vertical a 30 µl/min durante 60 s. Esto dio como resultado 50-250 UR de TREM-1 capturado y creó referencias de puntos intermedios solamente con anticuerpos de captura inmovilizados pero sin TREM-1 capturado en la dirección horizontal. Cada Fab se inyectó sobre celdas de flujo paralelas en dirección horizontal para permitir el análisis cinético de la unión a variantes de TREM-1 capturadas por anticuerpo anti-His. Antes de la inyección cada Fab se diluyó hasta 0, 5,5 (en un experimento), 16,7 y 50 nM en tampón de ejecución, y se inyectó a 100 µl/min durante 250 s (tiempo de asociación). El tiempo de disociación después de estas inyecciones se supervisó durante 10 minutos. La microplaca de GLM se regeneró después de cada ciclo de interacción de TREM-1 y Fab mediante dos inyecciones de 18 s de glicina 10 mM y NaOH 50 mM a 100 µl/min. Esta etapa de regeneración retiró las variantes de TREM-1 y cualquier Fab unido de la superficie de anticuerpo anti His, y permitió la unión posterior del siguiente par de interacción. El procedimiento de regeneración no retiró el anticuerpo de captura anti His directamente inmovilizado de la superficie de microplaca.

Para obtener datos cinéticos, tales como k_a (velocidad de asociación), k_d (velocidad de disociación) y K_D (constante de disociación en equilibrio), se realizaron análisis de datos usando el software ProteOn Manager™ 3.1.0.6. Se evaluaron los niveles de captura y unión de muestras procesadas por duplicado o triplicado para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión uniforme por toda la secuencia de inyecciones. No se observó ninguna unión inespecífica significativa con referencias de puntos intermedios con solamente anticuerpo de captura inmovilizado. Las curvas de unión se procesaron por resta de las señales de superficie de control de puntos intermedios, así como inyección de tampón de ejecución. Esto permitió la corrección con respecto a ruido instrumental y desplazamiento de volumen durante las inyecciones de muestras. La afinidad de Fab 0170 y Fab 0011 por diferentes variantes de ECD de TREM-1 en comparación con la afinidad con ECD de TREM-1 de cynomolgus o humano de tipo silvestre.

El nivel de unión 10 s después del final de la inyección de Fab, normalizado hasta el nivel de variante de TREM-1 capturado, también se evaluó para identificar versiones mutadas con unión anulada o muy baja. Una reducción de la afinidad combinada con un nivel de unión normalizado significativamente menor puede indicar un plegamiento alterado debido a mutaciones introducidas. Debería observarse sin embargo que los cambios en la cinética también afectarán a este valor. Cada curva de unión se inspeccionó por lo tanto visualmente para concluir (datos no mostrados).

Los resultados para TREM-1 humano con mutaciones individuales de alanina (Tabla 10) muestran que dos posiciones (E46 y D92) eran únicas porque reducían la unión más de dos veces con Fab 0170.

Tabla 10: Afinidad de Fab 0170 y Fab 0011 con TREM-1 humano con mutaciones de alanina en relación con un TREM-1 humano wt. Nivel de unión de Fab 0170 y Fab 0011 10 s después del final de la asociación, expresado como grado de nivel de unión máximo teórico

Construcción	Mutación	KD en relación con 0247		Unión normalizada (% de R _{máx} teórico)	
		Fab 0170	Fab 0011	Fab 0170	Fab 0011
0247	-	1	1	44	41
0221	D38A	0,7	15,0	29	5
0222	K40A	0,9	Sin unión	43	1
0223	D42A	132,9	26,9	13	3
0224	T44A	1,2	1,8	46	40
0225	E46A	2,7	0,9	44	44
0226	K47A	1,0	1,1	40	38
0227	S50A	0,7	0,9	45	41
0228	R84A	0,5	1,3	15	8
0229	Y90A	0,5	2,9	40	31
0230	H91A	0,9	2,5	41	33
0231	D92A	9,2	1,1	34	41
0232	H93A	36,4	5,2	22	29
0233	R97A	1,1	6,2	36	22
0234	R99A	0,8	1,0	15	11
0235	D127A	1,1	0,8	43	41
0236	R128A	0,9	1,2	39	35
0237	R130A	1,0	0,8	35	34

MAb -0170 fue, a diferencia de mAb -0011, capaz de unirse a TREM-1 de cynomolgus. La humanización de TREM-1

de cynomolgus en el área seleccionada no dio como resultado afinidad recuperada de 0177 en comparación con TREM-1 humano (0247) lo que indica que otros restos o combinaciones de restos son importantes para las diferencias en la afinidad por TREM-1 humano y de cynomolgus.

- 5 0243 no muestra ninguna unión a Fab 0170 o Fab 0011. Para esta construcción no puede excluirse que las mutaciones hayan afectado a la estructura general y por lo tanto no se puede concluir si Q52 está implicado en la unión de los Fab estudiados con TREM-1 humano.

10 **Tabla 11: Afinidad de Fab 0170 y Fab 0011 con ECD de TREM-1 de cynomolgus wt, variantes de ECD de TREM-1 de cynomolgus parcialmente humanizado y ECD de TREM-1 humano wt. El nivel de unión de Fab 0170 y Fab 0011 10 s después del final de la asociación, expresado como grado de nivel de unión máximo teórico.**

Construcción	KD (M)		Unión normalizada (% de R _{máx} teórico)	
	Fab 0170	Fab 0011	Fab 0170	Fab 0011
wt cTREM-1	1E-09	Sin unión	39	0
0239	2E-09	>1 µM	19	1
0240	2E-09	>1 µM	28	0
0241	2E-09	>1 µM	26	2
0242	1E-09	>1 µM	21	1
0243	Sin unión	Sin unión	5	1
0244	1E-09	Sin unión	7	0
0245	1E-09	Sin unión	34	0
0247	2E-10	1E-09	45	42

Ejemplo 14: mAb 0170 bloquea eficazmente la activación de TREM-1 en el ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1

- 15 El ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1 descrito en el Ejemplo 6 se usó para calcular la potencia de mAb 0170 en el bloqueo de TREM-1. Se estimularon células indicadoras BWZ/hTREM-1 con el complejo de ligando de TREM-1 y mAb 0170 añadido a diversas concentraciones. La Figura 9 muestra un bloqueo dependiente de dosis de la señal de TREM-1 que da como resultado bloqueo total de la señal a concentraciones mayores de 0,2 µg/ml. Se determinó que el valor de CI₅₀ era de 2,4 nM usando el software Graphpad Prism, ecuación: log(inhibidor) frente a respuesta – pendiente variable.

Ejemplo 15: Los anticuerpos de TREM-1 disponibles en el mercado no bloquean la activación de TREM-1 en el ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1.

- 25 Se incluyeron múltiples dosis de anticuerpo en el ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1, como se ha descrito previamente. SAB1405121 (clon 3F5 de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), WH0054210M4 (clon 2E2 de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), sc-80394 (clon 98Z12 de Santa Cruz, California, EE.UU.), HM2252 (clon 6B1 de Hycult biotech, 5405 PB UDEN, Países Bajos), 316102 (clon TREM-37 de Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.) y 314907 (clon TREM-26 de Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.), no fueron capaces de bloquear la actividad de TREM-1 significativamente, mientras que mAb 0170 desvelado en el presente documento pudo bloquear la actividad de TREM-1 con más del 99 % a 0,3 µg/ml. Los controles de isotipo tuvieron > 95 % de reactividad restante incluso a 3 µg/ml.

35 **Tabla 12**

Clon anti TREM-1	% de actividad restante a 0 µg/ml	% de actividad restante a 0,003 µg/ml	% de actividad restante a 0,03 µg/ml	% de actividad restante a 0,3 µg/ml
SAB1405121	100	104	101	97
WH0054210M4	100	98	104	86
sc-80394	100	120	134	131
HM2252	100	96	122	113
316102 (azida 0,09 %)	100	98	103	90
314907	100	100	124	108
mAb 0170	100	96	80	0

Ejemplo 16: El mAb 0170 bloqueó TREM-1 de cynomolgus

Para ensayar la funcionalidad contra TREM-1 de otra especie, se transfectó TREM-1 de ratón y de mono cynomolgus junto con DAP12 humano y de ratón, respectivamente, para generar un ensayo de células indicadoras como el de seres humanos. Esto se realizó esencialmente como se ha descrito para el sistema humano (Ejemplos 1, 2 y 6) pero reemplazando TREM-1 humano con TREM-1 murino (m) de longitud completa (SEQ ID NO: 22) o TREM-1 de mono cynomolgus (c) de longitud completa (SEQ ID NO: 21). Se sintetizó ADNc que codificaba cTREM-1 (SEQ ID NO: 22) en GeneArt y se clonó en pHLEF38 (autorizado por CMC ICOS), en la orientación XhoI - XbaI. Se cotransfectaron células TE alfa NFAT Luc con pHLEF38.cynoTrem1 y pNEF38.NFlag hDAP12 usando 10 µg de cada plásmido y 8e6 células electroporadas en aproximadamente 500 µl de volumen total (400 µl de medio de cultivo y 100 µl de ADN) usando el electroporador BTX (260 V, 1050 uF, 720 ohmios; la constante de tiempo fue de 23 ms). Las células se sembraron durante 48 horas en una placa de 10 cm, en 10 ml de medio acondicionado al 50 % y se sembraron directamente en selección a 8e3 células/pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano (5 placas) en 200 µl/pocillo de medio acondicionado al 30 % con G418 800 µg/ml y L-histidinol 0,5 mM. Después de 2 semanas de incubación, se identificaron 40 colonias individuales usando el capturador de imágenes Clone Select de Genetix.

El único anticuerpo de TREM-1 disponible en el mercado capaz de reaccionar de forma cruzada con TREM-1 de mono cynomolgus fue 314907 (clon TREM-26 de Biolegend, San Diego, CA 92121, EE.UU.) (véase Ejemplo 11). Ninguno de los anticuerpos disponibles en el mercado ensayado en el Ejemplo 15 fue capaz de bloquear la función de cynoTREM-1, ni siquiera el que pudo unirse a TREM-1 de mono cynomolgus.

Tabla 13

% de actividad de TREM-1 de cyno restante [cantidad de mAb]	mAb 0170	314907
0 µg/ml	100,00	100,00
0,74 µg/ml	7,97	103,97
20 µg/ml	0	87,72

De forma similar, se generó una línea celular indicadora con TREM-1 de ratón. Ninguno de los anticuerpos capaz de unirse a TREM-1 humano o con TREM-1 de cynomolgus y humano pudo unirse de forma cruzada a TREM-1 de ratón. Por lo tanto, se generaron anticuerpos contra TREM-1 de ratón esencialmente como se ha descrito para generar anticuerpos de TREM-1 humano pero con TREM-1 de ratón como el antígeno. Estos anticuerpos se exploraron con respecto a unión a TREM-1 de ratón y función de bloqueo en el ensayo de gen indicador murino. Uno de dichos anticuerpos (mAb 0174) fue capaz de unirse a y bloquear la función de TREM-1 de ratón.

Ejemplo 17: La liberación de TNFalfa de macrófagos M2 que se estimularon por PGLYRP-1 se bloqueó por anticuerpos de TREM-1

Los expertos en la materia reconocerán el valor de establecer una colección de banco congelado de células primarias de donantes múltiples proporcionando de este modo la replicación conveniente de experimentos. Se produjeron macrófagos obtenidos *in vitro* de monocitos de sangre periférica de la siguiente manera. Se aislaron monocitos enriquecidos negativamente de un "leucopak" de sangre periférica obtenido de Research Blood Components (Brighton, MA, EE.UU.) usando un kit Rosette Sep (cat. n.º 15068) de Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se suspendieron monocitos aislados en alícuotas de DMSO/FBS al 10 % de 50e6 células/ml y se enfrió gradualmente a -80 °C. Para producir células de macrófagos, se descongelaron rápidamente uno o más viales congelados de monocitos en un baño de agua a 37 °C, se diluyeron a 10 ml con medio de cultivo [RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad CA, EE.UU.) cat. n.º 72400-047] con FBS al 10 % (Fisher Scientific cat n.º 03-600-511) y se centrifugó durante 5 minutos a 250 g. Las células se suspendieron hasta 2e6 células/ml en medio de cultivo complementado con 50 ng/ml de MCSF humano (Gibco cat. n.º PHC9501), se colocaron en placas de cultivo tisular de estilo petri, tratadas con cultivo tisular, y en un incubador humidificado programado para mantener una atmósfera "hipóxica" de CO₂ 5 %, O₂ 2 %. El tercer día de cultivo, las células se alimentaron con la adición de un volumen igual de medio de cultivo complementado con 50 ng/ml de MCSF humano. Después de 6 días en cultivo los monocitos se habían diferenciado en macrófagos M0. Las células M0 se diferenciaron adicionalmente cambiando el medio a medio de cultivo complementado con IFNγ humano 50 ng/ml (Gibco cat n.º PHC4031) para macrófagos M1 o IL-4 humana 40 ng/ml (Gibco cat n.º PHC0045) para macrófagos M2 y devolviendo al incubador durante 22 horas adicionales. Al séptimo día, los macrófagos se diferenciaron convenientemente para usarlos en un bioensayo. Brevemente, se recuperaron macrófagos de las placas de Petri lavando con PBS 1X, seguido de EDTA 5 mM en PBS. Las placas se devolvieron después a 37 °C durante 30 minutos y las células se "lavarón a presión" de la placa usando una jeringa de 10 ml y aguja 22G. Las células se diluyeron después en medio de cultivo, se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos después de lo cual el sedimento celular se suspendió hasta una concentración final de 1e6/ml.

Se usaron células de macrófagos preparadas como anteriormente en bioensayos en los que se midieron citocinas

tales como TNF-alfa producida en respuesta a estimulación de las células con ligando de TREM-1 en el medio acondicionado por ELISA. Dicho bioensayo se utilizó adicionalmente para medir el bloqueo de dicha estimulación de ligando de TREM-1 por anticuerpos específicos de TREM-1. El ligando de TREM o controles negativos se prepararon a concentraciones 4X y se añadieron 50 microlitros/pocillo en medio de cultivo a placas de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones finales de ligando de TREM-1 consistieron en PGLYRP1 humano recombinante 7,5 ng/ml (véase Ejemplo 5) y PGN-BS 3 µg/ml (Invivogen, tlr-pgnbs, San Diego CA, EE.UU.). Las células se cultivaron en condiciones hipóxicas humidificadas como se ha descrito anteriormente durante 22 horas después de lo cual se recogió medio acondicionado y se midieron los niveles de TNFalfa por ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, catalogo DY210, MN, EE.UU.). La Figura 10 muestra que los anticuerpos de TREM-1 reducen la liberación de TNFalfa de estos macrófagos M2 estimulados. La Tabla 14, a continuación, muestra los valores de CI50 de dichos experimentos que indican que los anticuerpos desvelados en el presente documento son muy potentes en el bloqueo de la liberación de citocina dependiente de TREM-1.

Tabla 14

Anticuerpo (mAb)	R cuadrado	CI50, ng/ml
0122	0,99	14
0170	0,99	12
0090	0,99	21
0115	0,88	92

Ejemplo 18: La liberación de TNFalfa de macrófagos de cynomolgus puede bloquearse por mAb 0170

Los macrófagos derivados de sangre periférica sirven como un modelo *in vitro* excelente en el estudio de modulación y activación inmunitaria innata. Se sabe que TREM-1 desempeña un papel clave en el control de este proceso. El uso de la especie de primate no humana *Macaca fascicularis*, conocida habitualmente como mono cynomolgus es crítico para entender los efectos *in vivo* de la modulación de la señalización de TREM1. En este ejemplo se ensayan anticuerpos anti-TREM-1 con respecto a su capacidad para bloquear la producción de citocinas en cultivos de macrófago M2 de cynomolgus.

Se generaron células de macrófagos de la siguiente manera. Se recogió sangre completa de animales adultos machos sanos (SNBL, Everett WA, EE.UU.) por venopunción usando tubos vacutainer de heparina sódica (Cat n.º 3664870, Bectin Dickinson Franklin Lakes NJ, EE.UU.). Se diluyó sangre completa al 30 % con PBS, después se superpusieron cuidadosamente 30 ml en 15 ml de Ficoll-Paque (Cat n.º 17-1440-03 GE Healthcare, Uppsala Suecia) prediluido a 96 % con PBS en un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugación: 30 min, a temperatura ambiente, a 400 g con baja aceleración y sin freno; se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase de plasma/Ficoll, se diluyeron 3X con PBS y se centrifugaron 7 minutos, a temperatura ambiente, 200 g. Se aspiró y se descartó el sobrenadante que contenía plaquetas contaminantes y se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de PBS + FBS al 0,2 % (suero bovino fetal). Este proceso de lavado celular se repitió, 2 ciclos adicionales después de lo cual el sedimento de células PBMC se resuspendió en medio de cultivo RPMI (Cat n.º 61870-036, Life Technologies, Grand Island NY, EE.UU.) mas FBS 10 % a 2E6 células/ml y se distribuyeron en placas de Petri de 15 cm (Cat n.º 430599 Corning, Tewksbury MA, EE.UU.) a 20 ml/placa. Se permitió que los monocitos se adhirieran al plástico incubando durante una noche a 37 °C, CO₂ 5 %, 100 % de humedad después de lo cual las células no adherentes se retiraron por agitación suave y balanceo de las placas durante 20 segundos seguido de aspiración. Se añadieron 20 ml de medio de cultivo nuevo complementado con hMCSF 50 ng/ml (Cat n.º PHC9501, Life Technologies, Grand Island NY, EE.UU.) a cada placa y se colocó en condiciones de cultivo hipóxicas de 37 °C, CO₂ 5 %, O₂ 2 %, 100 % de humedad durante 7 días. El tercer día de cultivo, las células se alimentaron con la adición de un volumen igual de medio de cultivo complementado con MCSF humano 50 ng/ml. Después de 6 días en cultivo los monocitos se habían diferenciado en macrófagos M0. Las células M0 se diferenciaron adicionalmente cambiando el medio a medio de cultivo complementado con IFNg humano 50 ng/ml (Gibco cat n.º PHC4031) para macrófagos M1 o IL-4 humana 40 ng/ml (Cat n.º PHC0045, Life Technologies, Grand Island NY, EE.UU.) para macrófagos M2 y devolviendo al incubador 22 horas adicionales. Al séptimo día, los macrófagos se diferenciaron convenientemente para usar en un bioensayo. Brevemente, los macrófagos se recuperaron de las placas de Petri lavando con PBS 1X, seguido de EDTA 5 mM en PBS. Las placas se devolvieron después a 37 °C durante 30 minutos y las células se "lavarón a presión" de la placa usando una jeringa de 10 ml y aguja 22G. Las células se diluyeron después en medio de cultivo, se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos después de lo cual el sedimento celular se suspendió a una concentración final de 1e6/ml.

Las células de macrófagos preparadas como anteriormente se usaron en bioensayos en los que las citocinas tales como TNF-alfa producidas en respuesta a estimulación de las células con ligando de TREM-1 se midieron en el medio acondicionado por ELISA. Dicho bioensayo se utilizó adicionalmente para medir el bloqueo de dicha estimulación de ligando de TREM-1 por anticuerpos específicos de TREM-1. Se prepararon controles negativos o ligando de TREM-1 a concentraciones 4X y se añadieron 50 microlitros/pocillo en medio de cultivo a placas de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones finales de ligando de TREM-1 consistieron en PGLYRP1 humano recombinante 7,5 ng/ml (generado como se describe en el Ejemplo 5) y PGN-BS 3 µg/ml (Cat n.º tlr-pgnbs, Invivogen San Diego CA, EE.UU.). Se añadieron anticuerpos en 50 microlitros/pocillo de medio de cultivo seguido de

células en 50 microlitros/pocillo de macrófago. Las células se cultivaron en condiciones hipóxicas humidificadas como se ha descrito anteriormente durante 22 horas después de lo cual se recogió medio acondicionado y se midieron los niveles de TNFalfa por ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cat n.º DY1070 R&D Systems, Minneapolis MN, EE.UU.). La tabla a continuación muestra valores de TNF α de cultivos de macrófago M2 estimulados con ligando de TREM-1 (PGLYRP1+PGN) en presencia de anticuerpo de control o anticuerpo anti-TREM-1.

	TNF- α de donante 1, pg/ml		TNF- α de donante 2, pg/ml	
	Promedio	DT	Promedio	DT
Macrófagos M2 con:				
Solamente células	0,5		19,0	12,0
Solamente PGRP-S	3,5		13,0	6,3
Solamente PGN BS	5,7	2,8	22,4	3,8
PGN+PGRP-S	295,3	49,3	307,4	75,8
+Fc4 neg -3	248,5	54,0	285,0	57,6
+Fc4 neg -1	215,6	41,5	295,0	59,0
+Fc4 neg -0,33	217,5	49,7	357,7	118,6
+Fc4 neg -0,11	193,9	40,4	348,4	75,7
+Fc4 neg -0,037	172,6	57,6	370,7	88,6
+Fc4 neg -0,012	177,6	38,1	286,7	71,5
+Fc4 neg -0,0041	275,4	67,9	253,3	45,0
+0170-3	33,3	8,8	57,2	3,2
+0170-1	41,3	8,5	47,0	10,5
+0170-0,33	45,3	14,3	80,4	21,6
+00170-0,11	42,2	12,4	103,8	32,8
+0170-0,037	54,4	18,5	142,3	43,5
+0170-0,012	86,2	24,4	203,8	55,6
+0170-0,0041	186,7	21,0	249,3	92,5
+0170-0,0014	231,2	56,0	286,1	112,8
+0170-0,00046	246,4	22,7	254,2	70,5

Este ejemplo ilustra que el Ab- 0170 anti TREM-1 puede bloquear eficazmente la producción de citocina dependiente de TREM en células de macrófagos derivadas de monos cynomolgus. La eficacia de esta Ab apoya su uso en mono cynomolgus en toxicología *in vivo* y modelos de tratamiento de enfermedad.

Ejemplo 19: La liberación de TNFalfa de células mononucleares de sangre periférica estimuladas puede bloquearse por anticuerpos de TREM-1

PBMC, de una capa leucocítica y congelados en RPMI 1640 (Cat. n.º 61870, Gibco, Nueva York, EE.UU.), FBS 20 % (Cat n.º 16140-071, Gibco, Nueva York, EE.UU.), DMSO 10 % (Cat n.º D2650, Sigma, Steinheim, Alemania), se descongelaron y se lavaron dos veces en RPMI, FBS 10 %, Pen/Strep 1 % (Cat. n.º 15070-06, Gibco, Nueva York, EE.UU.) y se resuspendieron en el mismo medio a 4×10^6 /ml. Las células se distribuyeron después con 400.000 células/pocillo. Se añadieron PGN-SA 10 μ g/ml (Cat n.º tlr-pgnsa, Invivogen, San Diego, EE.UU.) y PGLYRP1 0,2 μ g/ml a los pocillos para estimular las células. Posteriormente, se diluyeron el isotipo relevante y anticuerpos de TREM-1 en RPMI y se añadieron a 1,34 nM y 0,167 nM respectivamente. La liberación de TNFalfa se midió por diaplex (Cat n.º 880.090.001, Genprobe, Besancon, Francia) de acuerdo con el protocolo del fabricante después de 20 h de incubación a 37 °C, CO₂ 5 %. Como se muestra en la Tabla 13, a continuación, los anticuerpos de TREM-1 desvelados en el presente documento (mAb 0044, 0070 y 0059) son todos capaces de reducir la liberación de TNFalfa de células PBMC.

Tabla 15

% de inhibición en comparación con isotipo	Isotipo a 1,34 nM	0 nM	0,167 nM
a-Trem-1 0044 (mIgG2a)	100	100	68
a-Trem-1 0070 (hIgG4)	100	117	76
a-Trem-1 0059 (hzlgG1.1)	100	105	61

La inhibición de aproximadamente el 70 % de liberación de TNFalfa en PBMC usando un anticuerpo de bloqueo de TREM-1 indica una influencia significativa en los niveles de citocinas en un cultivo celular estimulado.

Ejemplo 20: El mAb anti TREM-1 puede inhibir la producción de TNFa inducida por PGN+PGLYRP1 en macrófagos normóxicos

La estimulación de macrófagos usando PGN-BS+PGLYRP1 humano como un estimulante del receptor TREM-1 puede bloquearse por anticuerpos anti TREM-1.

Los monocitos se diferenciaron en macrófagos M2 como en el Ejemplo 15. Todas las etapas de la diferenciación y estimulación de las células se realizaron en un incubador de CO₂ 5 %, a 37 °C, con niveles de oxígeno atmosférico normales (normoxia). Los macrófagos M2 diferenciados se resuspendieron en RPMI/FBS 10 % y se sembraron en placas a 5x10⁵ células/ml en pocillos de ensayo triplicados (a no ser que se indique de otro modo). Las células se

5 estimularon después durante 24 horas con las siguientes estimulaciones: sin adición, PGLYRP1, PGN-BS (InVivogen, tlr-pgnbs) (dos conjuntos de triplicados), PGN-BS + PGLYRP1 (tres conjuntos de triplicados) o PGN-BS+PGLYRP1 en presencia de anticuerpo anti TREM-1 o de control de isotipo. Después se recogieron los sobrenadantes y se analizaron con respecto a TNFa usando BioPlex (Bio-Rad, 171-B5026M). Los anticuerpos (0,1 µg/ml) mAb-0122 y -0170 dirigidos contra TREM-1 fueron capaces de reducir la liberación de TNF-alfa.

Tabla 16

Macrófagos estimulados con:	TNFa Donante 1 pg/ml		TNFa Donante 2 pg/ml	
	Promedio	DT	Promedio	DT
Sin adición	0	0	0	0
PGLYRP1	0	0	0	0
PGN-BS	427	86	381	85
PGN-BS+PGLYRP1	728	293	771	220
PGN-BS+PGLYRP1 +control de isotipo hIgG4	987	183	884	41
PGN-BS+PGLYRP1 +mAb 0122	243	14	367	16
PGN-BS+PGLYRP1 +mAb 0170	122	106	224	54

Este ejemplo ilustra que los mAb anti TREM-1 -0122 y -0170 pueden inhibir la producción de TNFa de macrófagos cultivados en condiciones normóxicas.

15 Ejemplo 21: El anticuerpo de TREM-1 inhibe específicamente la respuesta inducida por líquido sinovial de la artritis reumatoide.

Las muestras de líquido sinovial de AR de pacientes que padecen artritis reumatoide se ensayaron con respecto a actividad de ligando de TREM-1 en el ensayo indicador de BWZ como se ha descrito en el Ejemplo 6. Brevemente, el líquido sinovial se descongeló, se sometió a agitación vorticial y se diluyó en serie, se ensayó por duplicado PGNECndi +/-10 µg/ml (Invivogen, San Diego, CA, EE.UU.) con la adición de anticuerpos de TREM-1 o un control de isotipo negativo. El líquido sinovial de un paciente con artritis reumatoide es capaz de desencadenar el ensayo de células indicadoras BWZ/hTREM-1 de una manera dependiente de TREM-1 que se potencia adicionalmente por la

20 adición de MAB1278 (R&D Systems, Mineápolis, MN 55413, EE.UU.: Cat. n.º MAB1278) mientras que los anticuerpos de bloqueo de TREM-1 desvelados en el presente documento son capaces de reducir esta activación.

Los anticuerpos se ensayaron en dos ensayos indicados por las dos columnas posteriores, cada anticuerpo en concentraciones que variaban de 0,1 a 10 µg/ml. MAB1278 potenció claramente la señal, mientras que mAb 0122 y

30 0170 redujeron la señal en comparación con el control de isotipo.

Tabla 17

Concentración	+ mAb 0122		+ mAb 0170		+ mAb 1278		+ control de isotipo IgG4	
10 µg/ml	80877	79731	52064	50304	1079000	1054000	306906	397556
1 µg/ml	74191	66458	48254	46978	1192000	1023000	398431	363267
0,1 µg/ml	133900	163521	246695	169483	828866	691379	293831	313445

35 Ejemplo 22: La liberación de citocinas de células de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide tras estimulación con PGLYRP-1 puede bloquearse por mAb 0170.

Se obtuvieron muestras de tejido sinovial de pacientes con AR durante el reemplazo de rodilla total. Se aisló la suspensión individual de células de tejido sinovial por una digestión mediante 4 mg/ml de colagenasa (cat n.º 11088793001, Roche, Mannheim, Alemania) y 0,1 mg/ml de DNasa (cat. n.º 11284932001, Roche, Mannheim, Alemania) durante 1 hora a 37 grados C.

Se estimularon células de tejido sinovial a 1x10⁵/pocillo en medio de cultivo RPMI (cat n.º R0883, St Louis, MO,

EE.UU.) + FCS 10 % (cat n.º S0115, BioChrom AG, Grand Island, NY 14072, EE.UU.) con 4 µg/ml de PGLYRP1 y 1 µg/ml de PGN-ECNDi (cat n.º tlr-kipgn, Invivogen, San Diego, CA 92121, EE.UU.) en condiciones hipóxicas en presencia o ausencia de diversas concentraciones de mAb 0170 o un control de hlgG4 de isotipo. Después de incubación durante 24 horas, los sobrenadantes celulares se recogieron y se midieron las citocinas por ELISA (TNFa (cat n.º DY210, R&D, Mineápolis, MN55413 EE.UU.), IL-1b (88-7010-88, eBioscience, San Diego, CA 92121, EE.UU.), GM-CSF (cat n.º 88-7339-88, eBioscience)) o Flowcytomix (TNFa, IL-1b, MIP-1b, MCP-1, IL-6 e IL-8 (cat n.º BMS, eBioscience)). Las citocinas se secretaron de las células de tejido sinovial tras estimulación con el ligando de TREM-1 y se bloquearon específicamente por el anticuerpo de TREM-1 mAb 0170.

- 10 A continuación hay un ejemplo de dicho experimento, en el que se usó mAb 4 ng/ml o 10 ng/ml dando como resultado una reducción de la liberación de citocinas cuando se trató con el anticuerpo de TREM-1 mAb 0170.

Tabla 18

Citocina (pg/ml)	PGN	PGN+PGLYRP1	PGN+PGLYRP1+ control 10 ng/ml	PGN+PGLYRP1+ mAb 0170 10 ng/ml
TNFalfa	624	1445	1034	429
MIP-1beta	2458	4395	3791	2321
MCP-1	273	471	391	210

- 15 Tabla 19

Citocina (pg/ml)	PGN	PGN+PGLYRP1	PGN+PGLYRP1+ control 4 ng/ml	PGN+PGLYRP1+ mAb 0170 4 ng/ml
IL-1 beta	2419	3773	3477	2308
GM-CSF	182	616	656	431
IL-6	2057	4189	3475	1632
IL-8	2575	5509	4499	2112

Este ejemplo muestra que las células de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide responderán a la estimulación por el ligando de TREM-1, PGLYRP1, secretando numerosas citocinas que pueden inhibirse por mAb 0170.

- 20 **Ejemplo 23: La liberación de TNFalfa inducida por PGLYRP1 de tipo II en células de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide puede bloquearse por el anticuerpo de TREM-1 mAb 0170**

- 25 Se obtuvieron muestras de tejido sinovial de pacientes con AR durante el reemplazo de rodilla total. Se aisló una suspensión individual de células de tejido sinovial por una digestión mediante 4 mg/ml de collagenasa (cat. n.º 11088793001, Roche, Mannheim, Alemania) y 0,1 mg/ml de DNasa (cat. n.º 11284932001, Roche, Mannheim, Alemania) durante 1 hora a 37 grados. Las células del tejido sinovial (1×10^5 /pocillo en medio de cultivo RPMI (cat. n.º 22400105, Gibco, NY 14072, EE.UU.) + FCS 10 % (cat. n.º S0115, BioChrom AG, Berlin, Alemania)) se cocultivaron con diversas dosis de células HEK transfectadas de forma transitoria con PGLYRP1 de tipo II en condiciones hipóxicas en presencia o ausencia de 1 µg/ml de mAb 0170 o control de isotipo IgG4. Después de incubación durante 24 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se midieron las citocinas por ELISA de TNFa (cat. n.º DY210, R&D, Mineápolis, MN55413 EE.UU.).

Tabla 20

	liberación de TNF-a (pg/ml)					
	1×10^5	3×10^4	1×10^4	3×10^3	1×10^3	0
PGLYRP1 de Tipo II (transfectado en HEK)/HEK de Control						
IgG4+células de Tipo II	121,17	114,08	95,02	54,56	57,87	33,47
IgG4+células de Control	55,65	63,73	57,99	33,78	36,40	36,32
mAb 0170+células de Tipo II	44,05	44,67	44,40	39,45	44,29	31,40
mAb 0170+células de Control	54,50	57,06	53,10	42,10	31,99	27,82

- 35 Este ejemplo muestra que el ligando de TREM-1 (células de tipo II) indujo la liberación de TNF alfa de una manera dependiente de dosis en células de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide en comparación con células de control (transfectadas de forma simulada). Esta respuesta de TNFalfa se bloqueó por mAb 0170 pero no con

isotipo IgG4. Las células de control no se vieron afectadas.

Ejemplo 24: MAB1278 unido a placa indujo respuesta de IL-6 y TNFalfa en macrófagos, mostrando características agonistas, mientras que los mAb 0122 y 0170 no.

La estimulación de macrófagos en anticuerpos agonistas anti TREM-1 unidos a placa indujo la producción de IL-6 y TNFa. Los monocitos se purificaron a partir de capas leucocíticas de donantes sanos usando RosetteSep (StemCell Technologies, 15068) y se diferenciaron en macrófagos cultivando durante 6 días en RPMI/FBS 10 % en presencia de MCSF humano 40 ng/ml. Los macrófagos se diferenciaron adicionalmente después en macrófagos M2 cambiando el medio a medio de cultivo complementado con IL-4 humana 50 ng/ml y devolviéndolo al incubador durante 24 horas adicionales. Al séptimo día, los macrófagos se recuperaron de las placas de cultivo lavando con PBS 1X, seguido de EDTA 5 mM en PBS. Las placas se devolvieron después a 37 °C durante 30 minutos antes de retirarse por lavado los macrófagos de las placas. Los macrófagos se lavaron en RPMI/FBS 10 % antes de resuspender y sembrar en placas. Los pocillos de ensayo se habían prerrecubierto con los anticuerpos específicos incubándolos durante una noche con anticuerpo diluido en PBS, seguido de lavado x3 en PBS. Los macrófagos resuspendidos se sembraron en placas a 5×10^5 células/ml en pocillos de ensayo por triplicado seguido de incubación durante 24 horas. (Todas las etapas de la diferenciación y estimulación de las células se realizaron en un incubador de CO₂ 5 %, a 37 °C, con niveles de oxígeno atmosférico normales (normoxia)). Los sobrenadantes se recogieron después y se analizaron con respecto a IL-6 y TNFa usando BioPlex (Bio-Rad, 171-B5006M y 171-B5026M).

Los anticuerpos mAb-0122 y 0170 mostraron un efecto agonista muy bajo, mientras que el anticuerpo MAB1278 (RnD Systems, MAB1278) mostró una potente inducción tanto de IL-6 como de TNFa.

Tabla 21

	IL-6 pg/ml		TNFa pg/ml	
Estimulación de mAb unido a placa:	Promedio	DT	Promedio	DT
Sin anticuerpo	1	3	0,3	0,8
isotipo de mlgG1 cntr 2 µg/ml	0	0	0	0
isotipo de mlgG1 cntr 6 µg/ml	0	0	0	0
isotipo de mlgG1 cntr 20 µg/ml	14	24	5	5
MAB1278 2 µg/ml	412	71	2004	451
MAB1278 6 µg/ml	877	38	6454	278
MAB1278 20 µg/ml	1352	76	7753	555
isotipo de hlgG4 cntr 2 µg/ml	5	5	2	1
isotipo de hlgG4 cntr 6 µg/ml	18	15	9	9
isotipo de hlgG4 cntr 20 µg/ml	37	3	34	1
mAb 0122 2 µg/ml	93	48	59	18
mAb 0122 6 µg/ml	126	8	105	17
mAb 0122 20 µg/ml	234	10	304	26
mAb 0170 2 µg/ml	137	29	76	21
mAb 0170 6 µg/ml	181	12	187	28
mAb 0170 20 µg/ml	277	15	629	108

Este ejemplo ilustra que los mAb-0122 y 0170 muestran solamente actividad agonista muy baja en macrófagos e indica verdaderas características de bloqueo de estos mAb.

Ejemplo 25: el bloqueo de TREM-1 en un modelo de artritis de ratón reduce la enfermedad.

Los experimentos perfilados en la Tabla 22 se obtuvieron en el modelo de artritis de DTH, que es un modelo de artritis en una única pata. Se indujo artritis de una única pata en ratones C57BL/6 hembra induciendo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado clásica (DTH) en la pata trasera derecha por inmunización y posterior exposición a albúmina de suero bovino metilada (mBSA), con la modificación de que se administró un cóctel de anticuerpos monoclonales de colágeno de tipo II (anti CII) IV entre las etapas de inmunización y exposición. La pata

trasera izquierda recibió exposición a PBS y actuó como un control dentro del animal. Los ratones (10 ratones/grupo) se trataron 3 veces/semana con un anticuerpo monoclonal de TREM que se une específicamente y bloquea TREM-1 murino, como se determina usando una versión murina del ensayo indicador descrito en el Ejemplo 6. La primera dosis se administró el día de inmunización. Los ratones (9-10 ratones/grupo) se trataron con un anticuerpo de control o PBS como un control. Se midió la hinchazón de la pata desde el día de la inducción de artritis y los siguientes 11 días. Los resultados se presentan como una área media bajo la curva (ABC) $\pm$ ETM. La significación estadística se ensayó usando un ensayo de t para muestras no relacionadas de dos caras, intervalo de confianza al 95 %.

Tabla 22: efecto del tratamiento con TREM-1 en la hinchazón de la pata (ABC-mm) en un modelo de artritis de ratón

Medición del efecto	Experimento	mAb de TREM-1 [§]	mAb de control [§]	PBS
hinchazón de la pata ABC-mm	n.º 1	8,03 $\pm$ 1,01**	12,26 $\pm$ 0,84	12,53 $\pm$ 0,87
hinchazón de la pata ABC-mm	n.º 2	8,45 $\pm$ 0,94**	11,71 $\pm$ 0,22	12,89 $\pm$ 0,36
Media $\pm$ ETM. § ratones tratados con 5 mg/kg, 3 veces/semana durante 3 semanas **P $\leq$ 0,005, ensayo de t de muestras no relacionadas de dos caras, intervalo de confianza al 95 % frente a mAb de control y frente a PBS				

Ejemplo 26: Los neutrófilos activados liberan IL-8 lo que puede bloquearse por mAb de TREM-1

Los neutrófilos expresan TREM-1 y los neutrófilos también expresan el ligando de TREM-1. Para ensayar si TREM-1 estaba implicado en un bucle de estimulación autocrina en neutrófilos, se estimularon neutrófilos aislados con PGN-SA (InVivogen, tlr1-pgnsa), y se midió la liberación de IL-8 en el medio de cultivo. Los anticuerpos de TREM-1 mAb-0059, 0067, 0122 y 0170 fueron capaces de reducir la liberación de IL-8 inducida por PGN-SA. Los neutrófilos se aislaron de sangre completa de donante sano humano y se resuspendieron en RPMI/FBS 10 % a $1,5 \times 10^6$ células/ml y se sembraron en pocillos de ensayo por triplicado prerrecubiertos con fibrinógeno (prerrecubiertos con 50 l de Fibrinógeno 1 mg/ml (Sigma, F3879) en PBS durante 2 horas a 37 °C, seguido de lavado x3 en PBS). Las células se ensayaron en las siguientes condiciones: sin estimulación añadida, solamente PGN-SA 10 g/ml o PGN-SA 10 g/ml en presencia de mAb-0059, 0067, 0122, 0170 o anticuerpo de control de isotipo a 0,25 g/ml. Las muestras se cultivaron durante 24 horas en un incubador de CO₂ 5 %, a 37 °C. Los sobrenadantes se recogieron después y se analizaron con respecto a IL-8 usando el conjunto de Citocina Humana IL-8 Bio-plex Pro (BioRad, 171-B5008M).

Tabla 23

Experimento 1 Neutrófilos estimulados con:	IL-8, pg/ml		Experimento 2 Neutrófilos estimulados con:	IL-8, pg/ml	
	Promedio	DT		Promedio	DT
Sin adición	N.D.	N.D.	Sin adición	857	214
PGN-SA	562	54	PGN-SA	6116	191
PGN-SA + control de isotipo hlgG1.1	461	80	PGN-SA + control de isotipo hlgG4	6530	1962
PGN-SA+mAb 0059	165	55	PGN-SA+mAb 0122	2466	437
PGN-SA+mAb 0067	183	77	PGN-SA+mAb 0170	2171	480

Este ejemplo ilustra que la liberación de IL-8 de neutrófilos inducida por estimulación con el PGN obtenido de bacterias puede reducirse por anticuerpos de TREM-1. De este modo se demuestra que TREM-1 está implicado en un bucle de activación autocrino en neutrófilos, y los anticuerpos de TREM-1 son potencialmente útiles en la regulación negativa de respuestas de neutrófilos.

Ejemplo 27: Los neutrófilos activados pueden estimular monocitos, que pueden bloquearse por mAb anti TREM-1

Los neutrófilos activados expresan el ligando de TREM-1. Para ensayar si los neutrófilos activados pueden estimular otras células inmunitarias de una manera dependiente de TREM-1, los neutrófilos activados se usaron para estimular monocitos aislados y se midió la liberación de TNF α en el medio de cultivo. Los anticuerpos de TREM-1 mAb-0059 y 0170 fueron capaces de reducir la liberación de TNF α inducida por neutrófilos de los monocitos.

Los neutrófilos se aislaron de sangre completa de donante sano humano y se resuspendieron en RPMI/FBS 10 % y se sembraron a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo tisular recubiertas con poli-D-lisina (Corning, 3841). Los neutrófilos se estimularon después con PMA 1 ng/ml (Sigma, P1585) + PGN-SA 20 g/ml (InVivogen, tlr1-pgnsa) durante 24 horas en un incubador de CO₂ 5 % a 37 °C. Las células se lavaron después

suavemente x3 con medio antes de añadir monocitos recién aislados. Los monocitos se purificaron de capas leucocíticas de donantes sanos usando un kit EasySep (Stem cell technologies, 19059) y se sembraron con 5×10^4 células/pocillo en los pocillos que ya contenían neutrófilos lavados, activados. Los siguientes anticuerpos se añadieron a 1 g/ml: mAb-0059, mAb-0170 o control del isotipo hlgG4. Las células se cultivaron después durante otras 24 horas antes de recoger el sobrenadante. El sobrenadante se diluyó 1:10 en RPMI/FNS 10 % antes de medir TNFa mediante ELISA (eBioscience, BMS223INST).

Tabla 24

Monocitos estimulados con:	TNFa pg/ml	
	Promedio	DT
Sin neutrófilos	34	85
Neutrófilos activados	299	67
Neutrófilos activados + control de isotipo	232	32
Neutrófilos activados + mAb 0059	72	14
Neutrófilos activados + mAb 0170	129	9

10 Este ejemplo ilustró que los neutrófilos activados pueden estimular monocitos de una manera dependiente de TREM-1 para producir TNFa, y esto puede bloquearse por los anticuerpos anti TREM-1 mAb-0059 y mAb-0170. Los anticuerpos anti TREM-1 son por lo tanto potencialmente útiles para regular negativamente las respuestas de monocitos.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

20 <120> Anticuerpos que son capaces de bloquear un receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 (TREM-1)

<130> 8492

25 <160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 234

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

ES 2 640 268 T3

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

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 640 268 T3

<400> 2

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

5 <210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 3

ES 2 640 268 T3

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 4

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(448)

<223> cadena pesada de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<400> 4

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

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

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

ES 2 640 268 T3

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

ES 2 640 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(218)

<223> cadena ligera de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<400> 5

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

ES 2 640 268 T3

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

<210> 6
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)..(448)
 <223> cadena pesada de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

<400> 6

ES 2 640 268 T3

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

ES 2 640 268 T3

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

<210> 7
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 640 268 T3

<220>

<223> cadena ligera de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

5

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(218)

<223> cadena ligera de un anticuerpo de TREM-1 humanizado

10

<400> 7

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 8

20

ES 2 640 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

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

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

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

ES 2 640 268 T3

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Val Arg Asp Met Gly Gln Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 135 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

10

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 11

ES 2 640 268 T3

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 12

<211> 180

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 12

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

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

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

ES 2 640 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Ile Arg
180

<210> 13

<211> 206

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 13

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

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

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

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

ES 2 640 268 T3

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A24/Y28F/N30S/R32Q/P70N-cTREM-1-Cmyc2-Nis6

<400> 14

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

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

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

ES 2 640 268 T3

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

<210> 15

<211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 15

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

ES 2 640 268 T3

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 29

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 16

tagtagggat ccgctggtgc acaggaagg
29

15

<210> 17

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador

ES 2 640 268 T3

<400> 17

tagtaggcgg ccgcttcgtg ggcctagggg ac
32

5

<210> 18
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

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

<400> 18

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
35 40 45

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
50 55 60

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
65 70 75 80

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
85 90 95

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

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
115 120 125

15

Ile Arg Leu Val Val Thr His His His His His His
130 135 140

<210> 19
<211> 205
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> cTREM-1-Cmyc2-Ills6

25

<400> 19

ES 2 640 268 T3

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

<210> 20
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 20

ES 2 640 268 T3

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

<210> 21

<211> 233

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 21

ES 2 640 268 T3

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr
35 40 45

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

Ile Leu Ala Lys Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln
65 70 75 80

Val Gly Arg Ile Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln
85 90 95

Val Gln Met Thr Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
100 105 110

Val Ile Tyr Gln His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile
115 120 125

Cys Leu Val Val Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu
130 135 140

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

Leu Gly Pro Arg Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro
165 170 175

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

Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile Ile
195 200 205

Val Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Phe
210 215 220

Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Gly Pro
225 230

<210> 22
<211> 230
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

ES 2 640 268 T3

```

Met Arg Lys Ala Gly Leu Trp Gly Leu Leu Cys Val Phe Phe Val Ser
1          5          10          15

Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Leu Glu Glu Glu Arg Tyr Asp Leu Val
20          25          30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Val Val Ser Ser Pro Gly Leu Gly Val Thr Ile Ile Asn Gly
180         185         190
Thr Asp Ala Asp Ser Val Ser Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Ile
195         200         205

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

Thr Lys Arg Thr Phe Gly
225         230

```

5 <210> 23
 <211> 175
 <212> PRT

ES 2 640 268 T3

<213> *Homo Sapiens*

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn
145                      150                      155                      160
Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro
                      165                      170                      175

```

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que es capaz de unirse específicamente a y de bloquear TREM-1, en donde el anticuerpo, o el fragmento del mismo, es capaz de bloquear la activación de TREM-1 inducida por PGLYRP1, y tiene un epítipo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o todos los restos de aminoácidos D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44 y L45 y uno, dos o todos los restos de aminoácidos E46, K47, F48 de SEQ ID NO: 1 que representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 humano.
2. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que compite con mAb 0170 por la unión a SEQ ID NO: 1 que representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 humano, en donde mAb 0170 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
3. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que compite con mAb 0170 por la unión a SEQ ID NO: 12 o a SEQ ID NO: 21 que representan secuencias de aminoácidos de TREM-1 de mono cynomolgus, en donde mAb 0170 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
4. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es capaz de unirse específicamente a un polipéptido que comprende los aminoácidos D38 a F48 de SEQ ID NO: 1 que representa la secuencia de aminoácidos de TREM-1 humano.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es capaz de unirse específicamente a SEQ ID NO: 13 que representa la secuencia de aminoácidos de K20A-hTREM-1-Cmyc2-His6.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es capaz de unirse específicamente a SEQ ID NO: 14 que representa la secuencia de aminoácidos de A24T/Y28F/N30S/R32Q/P70H-cTREM-1-Cmyc2-His6.
7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es capaz de unirse específicamente a SEQ ID NO: 15 que representa la secuencia de aminoácidos de A24T/Y28F/N30S/R32Q/E54K-cTREM-1-Cmyc2-His6.
8. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, cuya cadena pesada comprende una secuencia de CDRH1 correspondiente a los restos de aminoácidos 31 a 35 representados por los aminoácidos TYAMH de SEQ ID NO: 4, en donde uno de estos restos de aminoácidos puede sustituirse con un resto de aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRH2 correspondiente a los aminoácidos 50 a 68 representados por los aminoácidos RIRTKSSNYATYYAASVKG de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos o tres de dichos aminoácidos pueden sustituirse con un resto de aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRH3 correspondiente a los restos de aminoácidos 101 a 110 representados por los aminoácidos DMGIRRFAY de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos o tres de dichos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y cuya cadena ligera comprende una secuencia de CDRL1 correspondiente a los restos de aminoácidos 24 a 38 representados por los aminoácidos RASEVDTFDYSFLH de SEQ ID NO: 5, en donde uno, dos o tres de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRL2 correspondiente a los restos de aminoácidos 54 a 60 representados por los aminoácidos RASNLES de SEQ ID NO: 5, en donde uno o dos de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o una secuencia de CDRL3 correspondiente a los restos de aminoácidos 93 a 101 representados por los aminoácidos QQSNEPYPY de SEQ ID NO: 5, en donde uno o dos de estos restos de aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, cuya cadena pesada comprende una secuencia de CDRH1 correspondiente a los restos de aminoácidos 31 a 35 representados por los aminoácidos TYAMH de SEQ ID NO: 4; y/o una secuencia de CDRH2 correspondiente a los aminoácidos 50 a 68 representados por los aminoácidos RIRTKSSNYATYYAASVKG de SEQ ID NO: 4; y/o una secuencia de CDRH3 correspondiente a los restos de aminoácidos 101 a 110 representados por los aminoácidos DMGIRRFAY de SEQ ID NO: 4; y cuya cadena ligera comprende una secuencia de CDRL1 correspondiente a los restos de aminoácidos 24 a 38 representados por los aminoácidos RASEVDTFDYSFLH de SEQ ID NO: 5; y/o una secuencia de CDRL2 correspondiente a los restos de aminoácidos 54 a 60 representados por los aminoácidos RASNLES de SEQ ID NO: 5; y/o una secuencia de CDRL3 correspondiente a los restos de aminoácidos 93 a 101 representados por los aminoácidos QQSNEPYPY de SEQ ID NO: 5.
10. El anticuerpo, o fragmento del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso como un medicamento.

Fig. 1

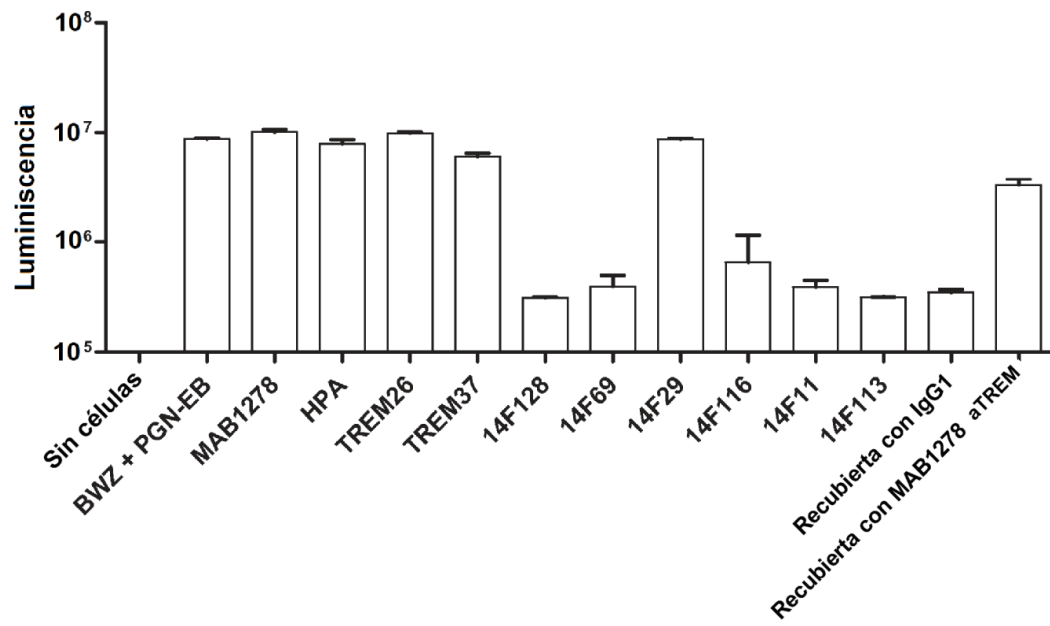


Fig. 2

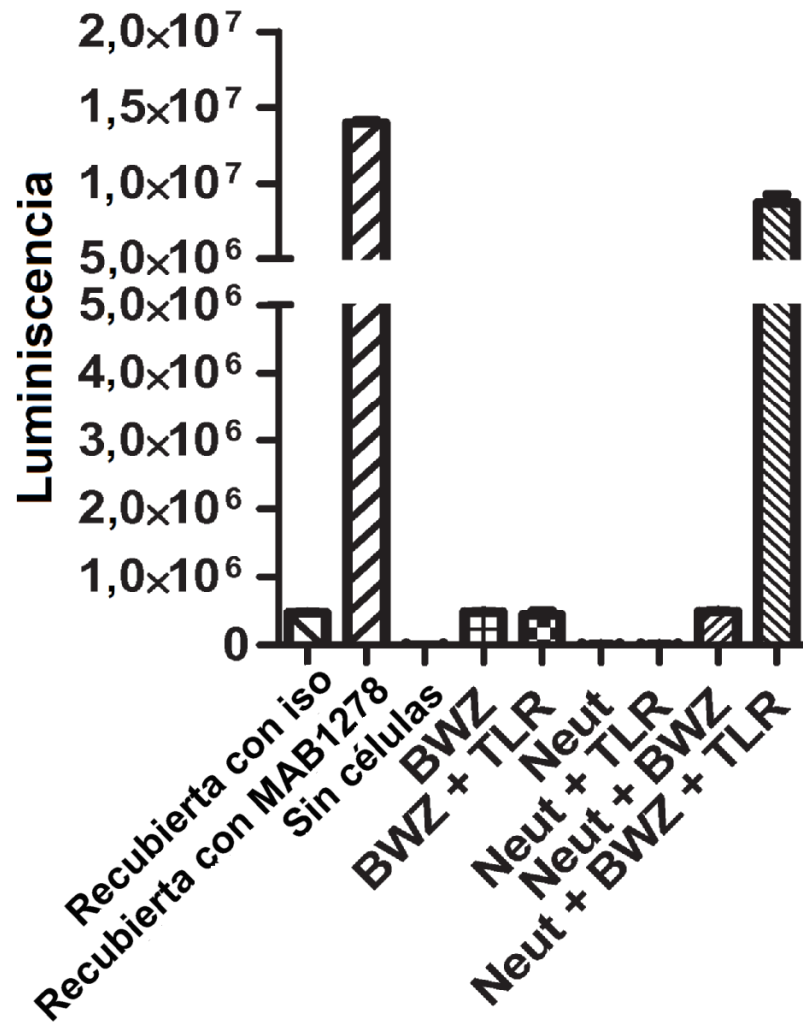


Fig. 3

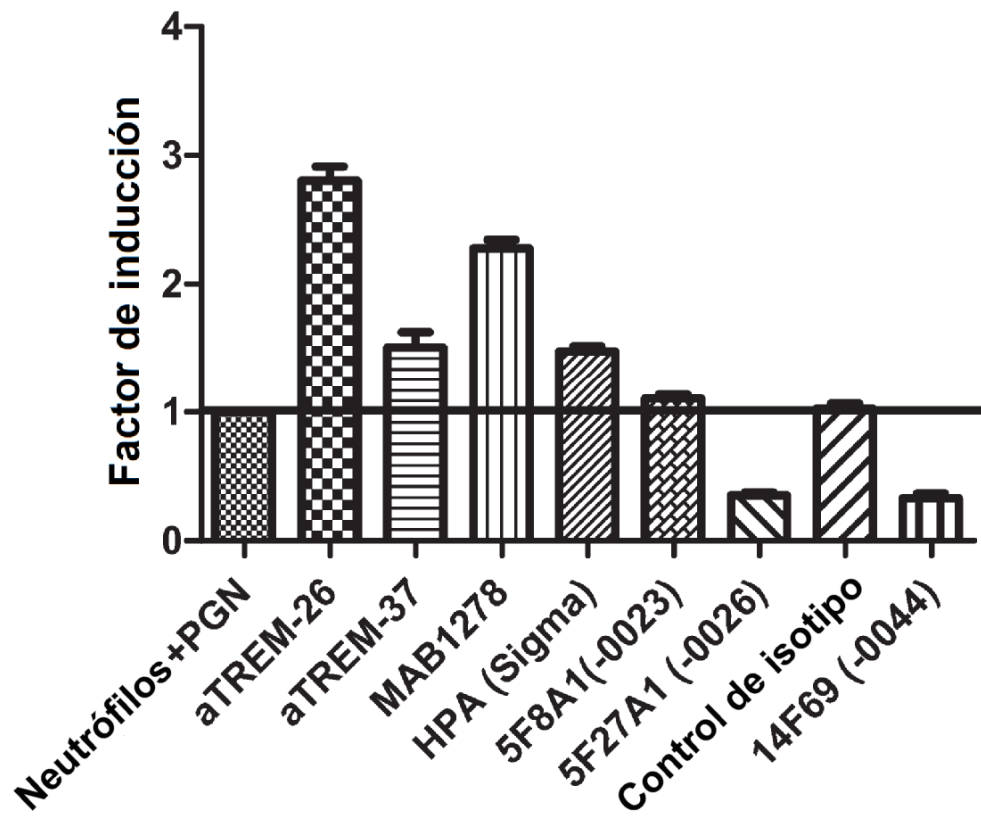


Fig. 4

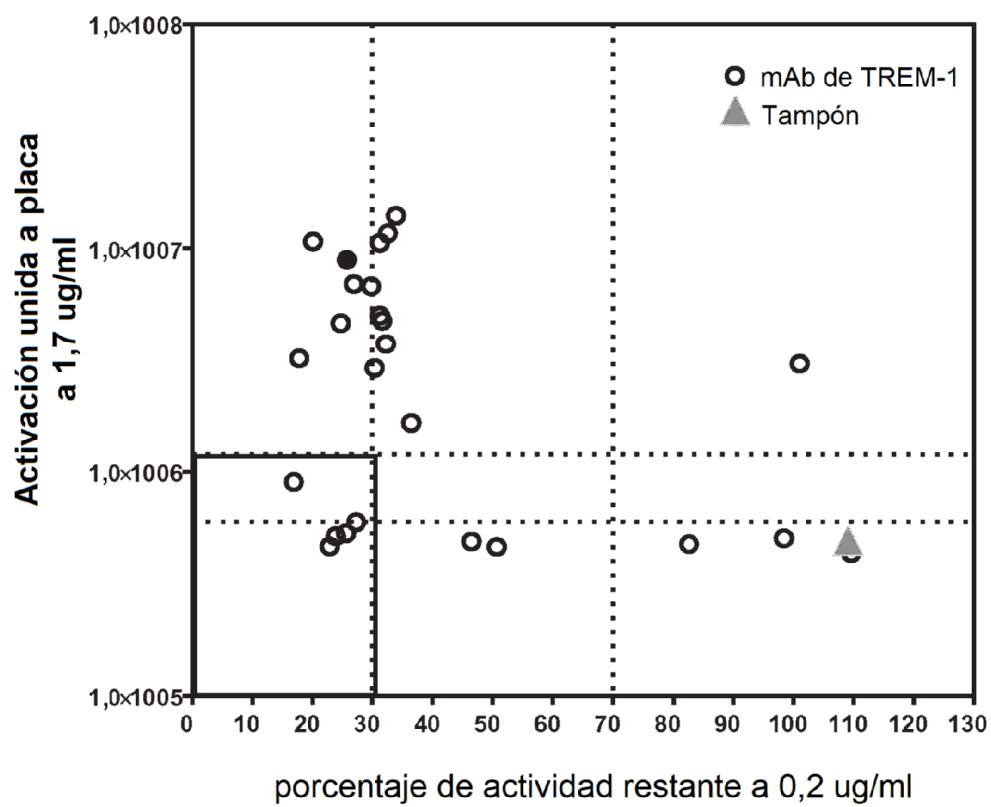


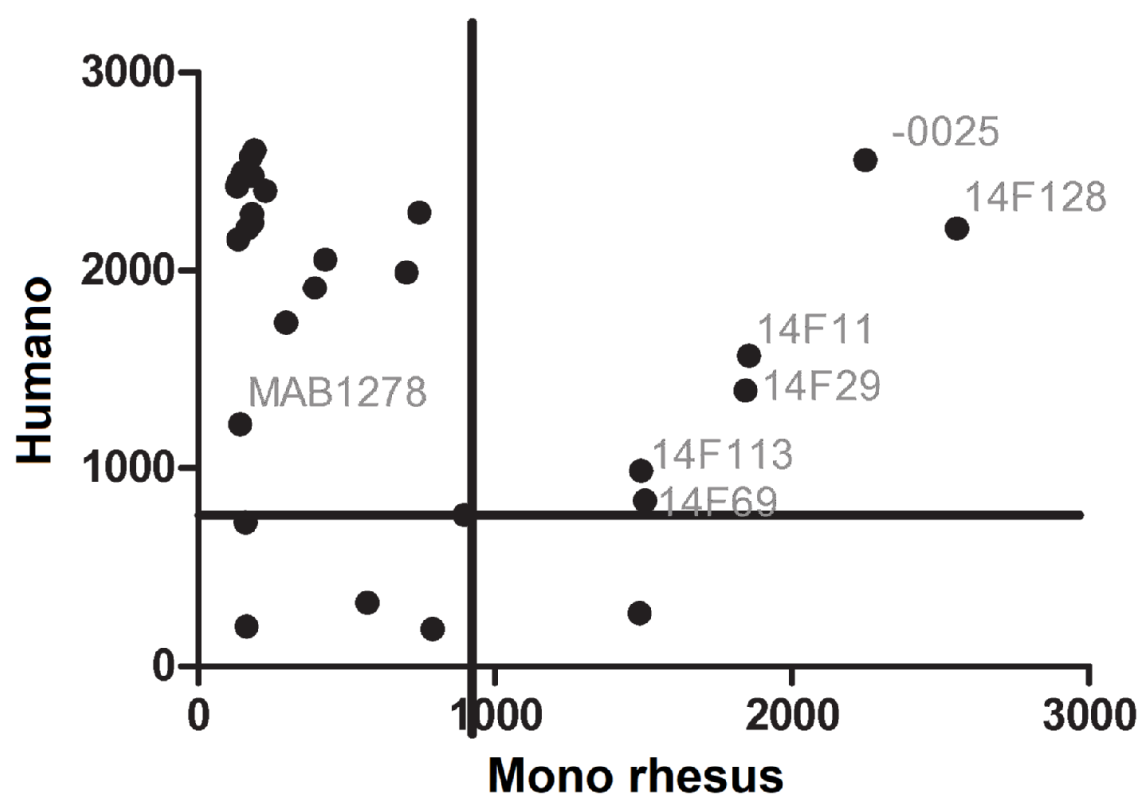
Fig. 5

Fig. 6A

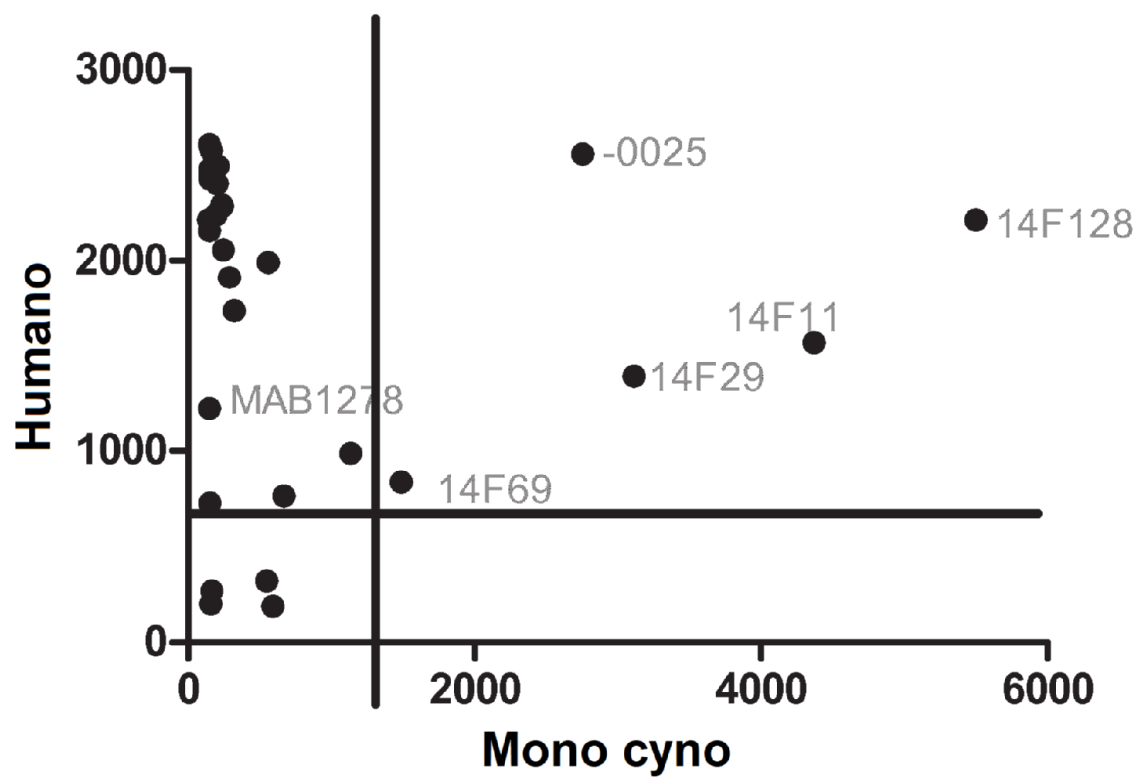


Fig. 6B

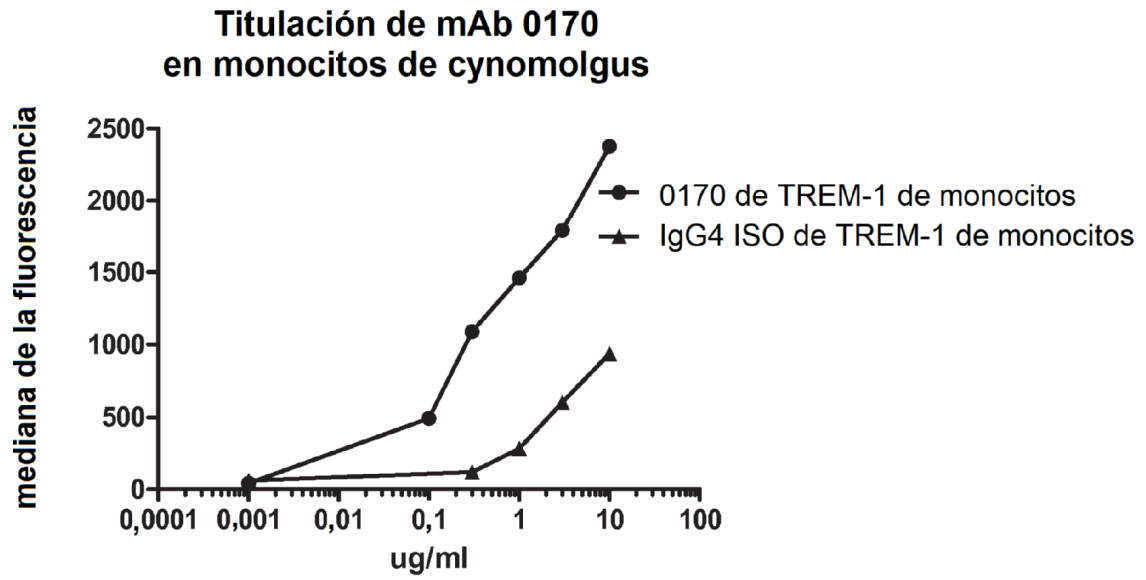


Fig. 6C

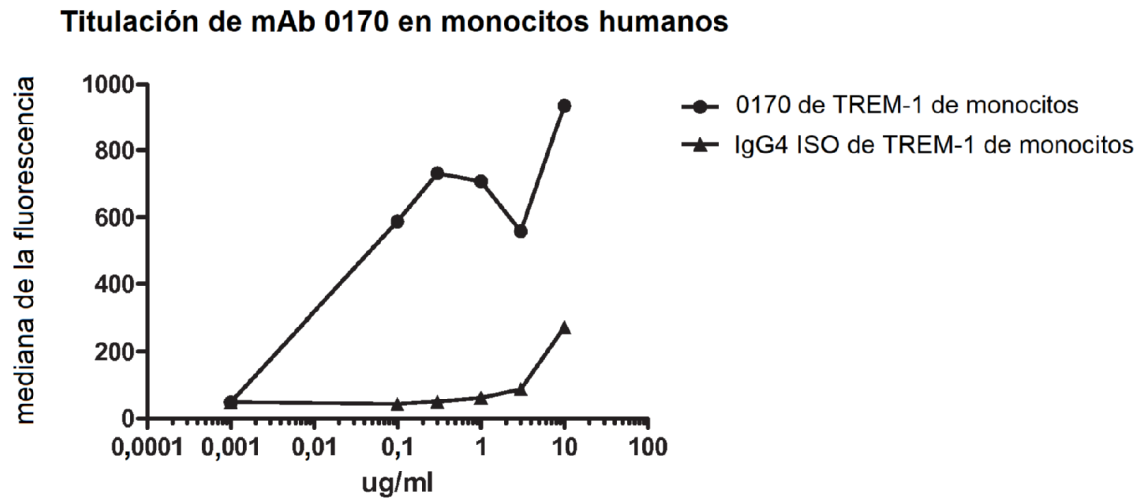


Fig. 7A

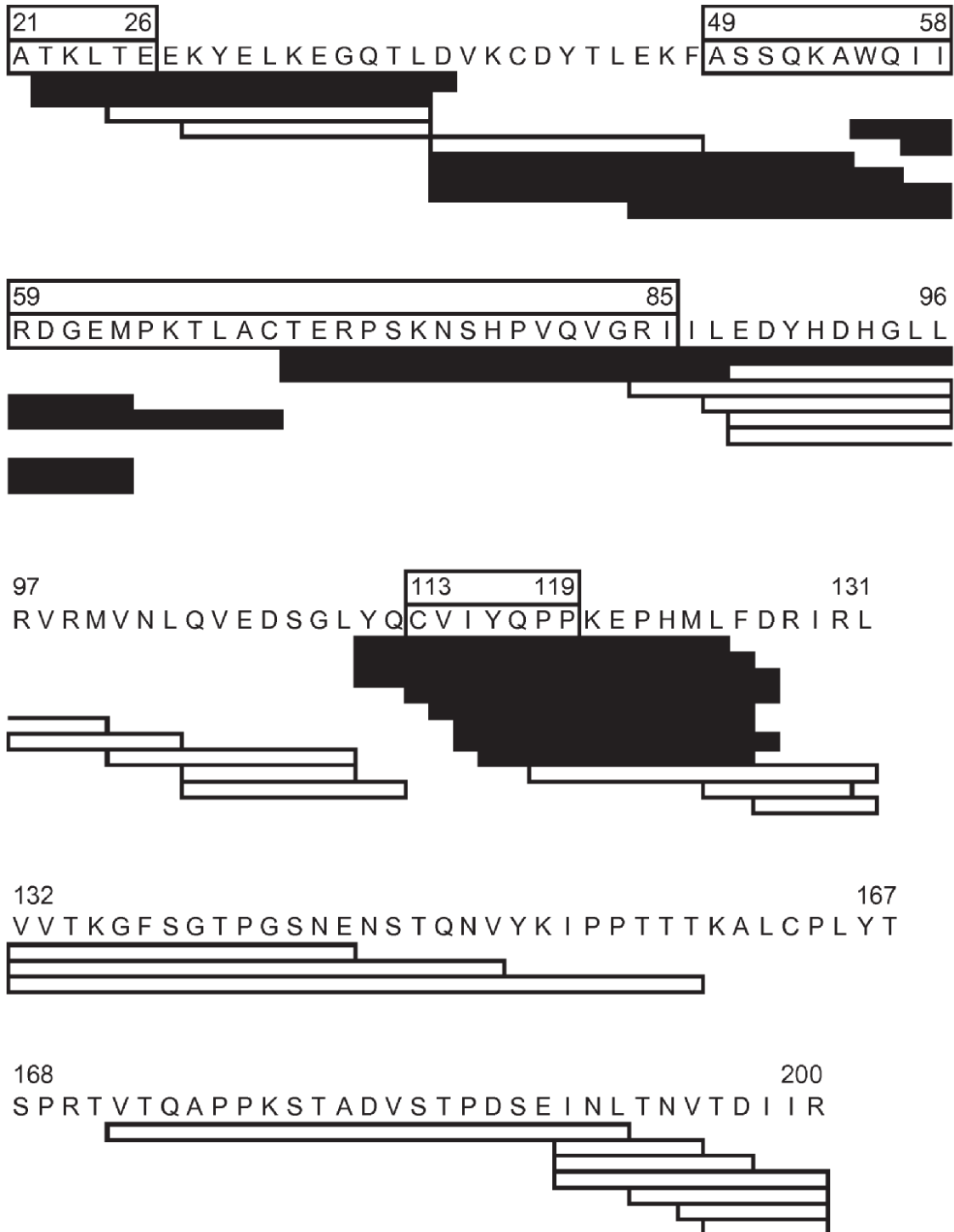


Fig. 7B

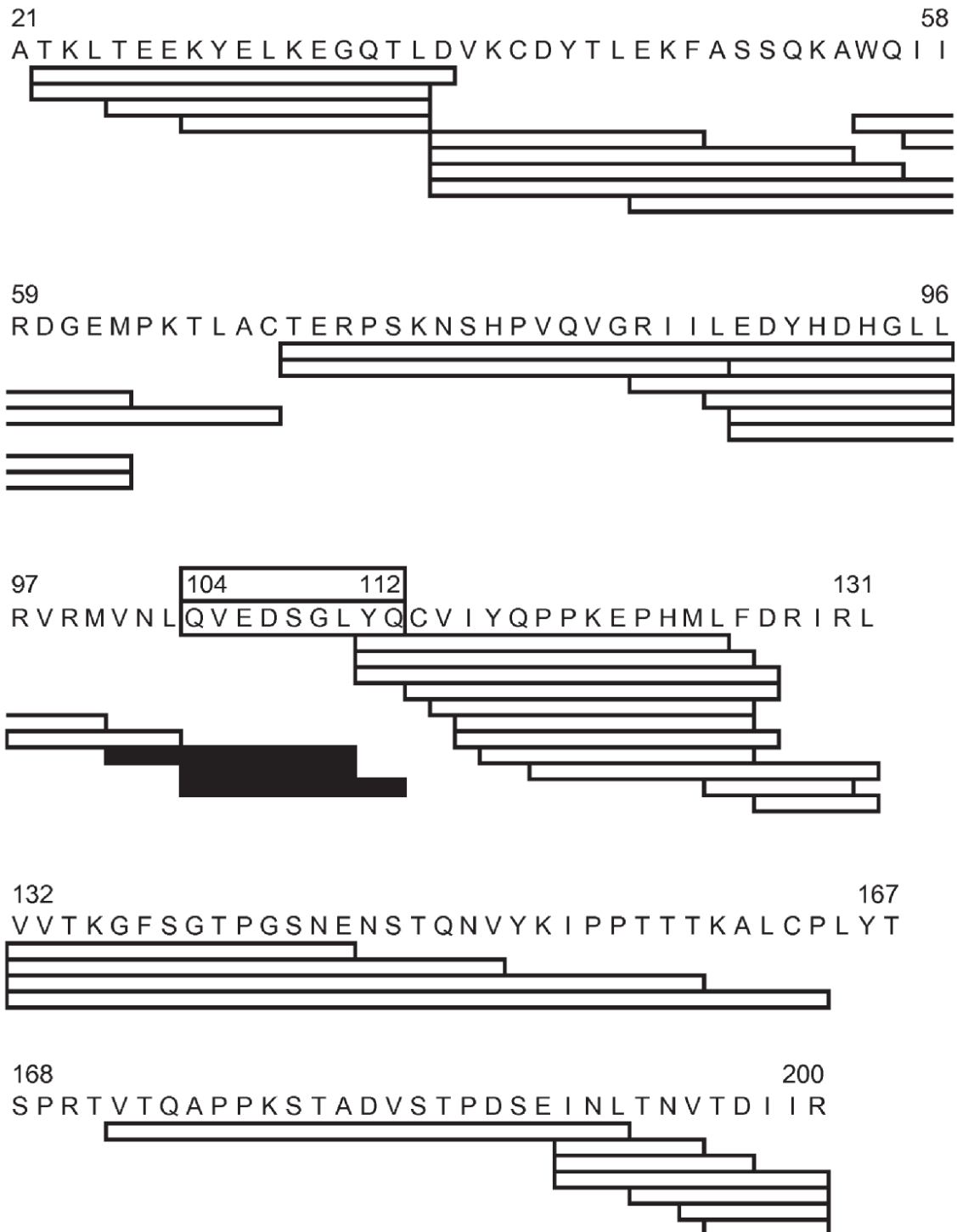


Fig. 7C

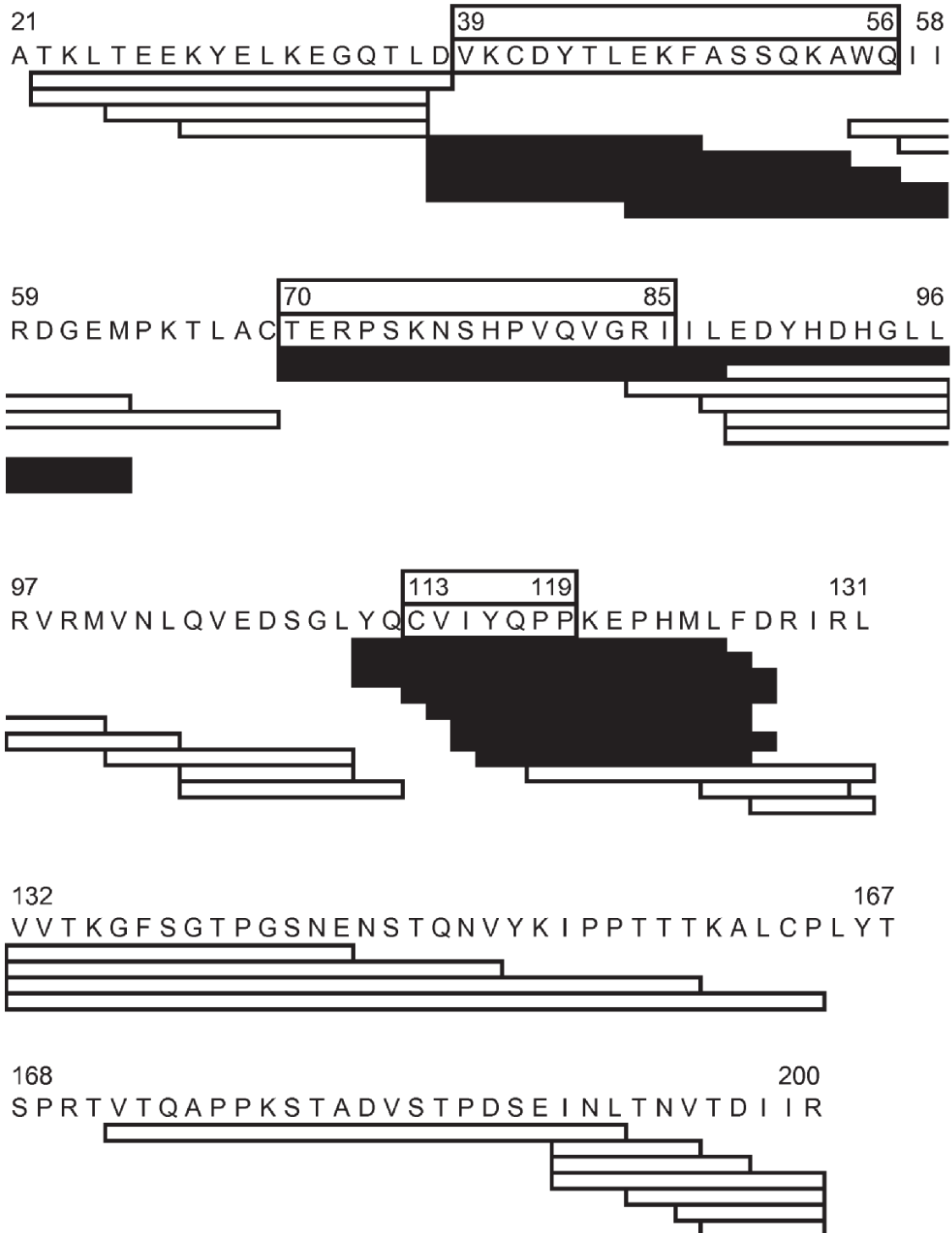


Fig. 7D

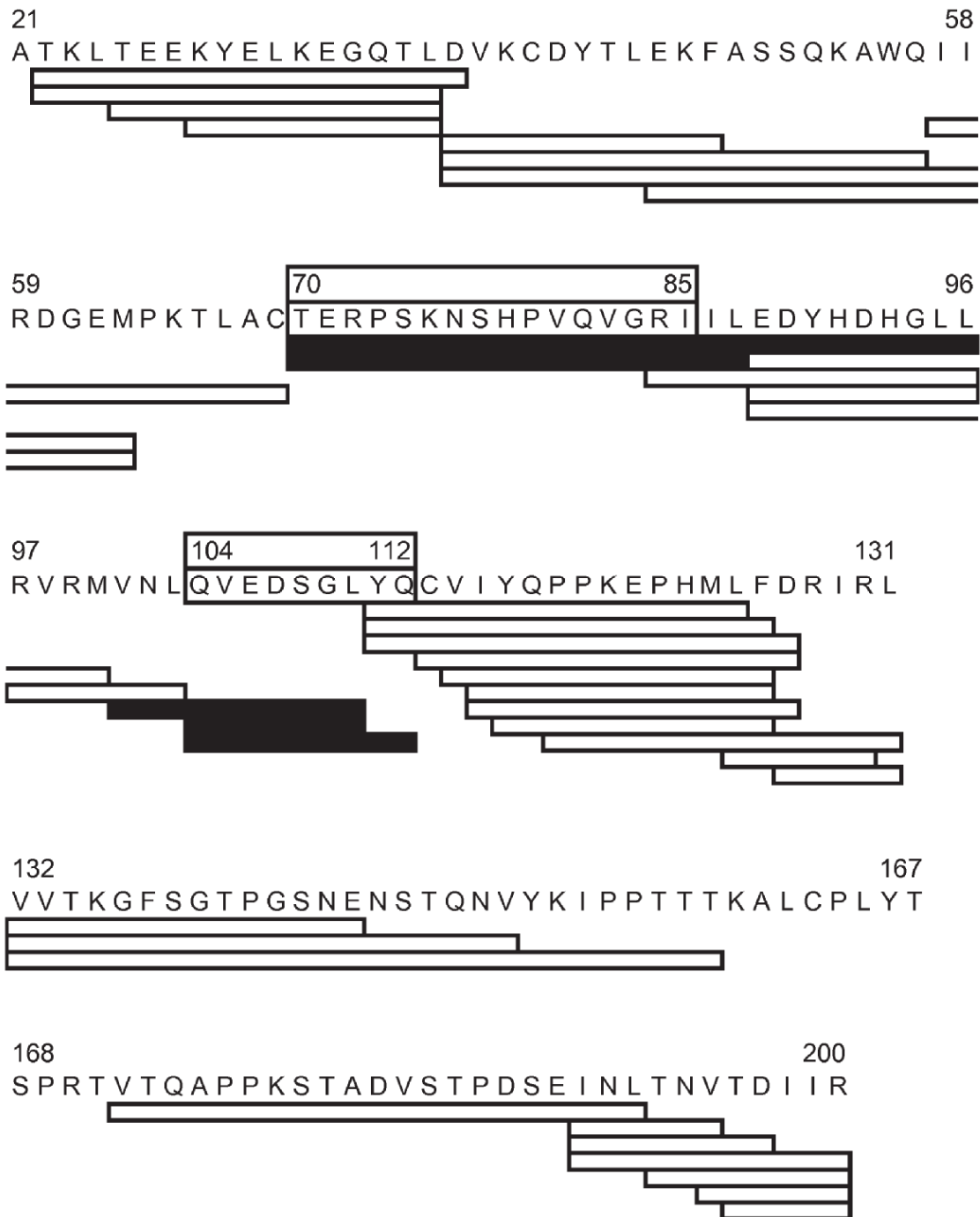


Fig. 8



Fig. 9

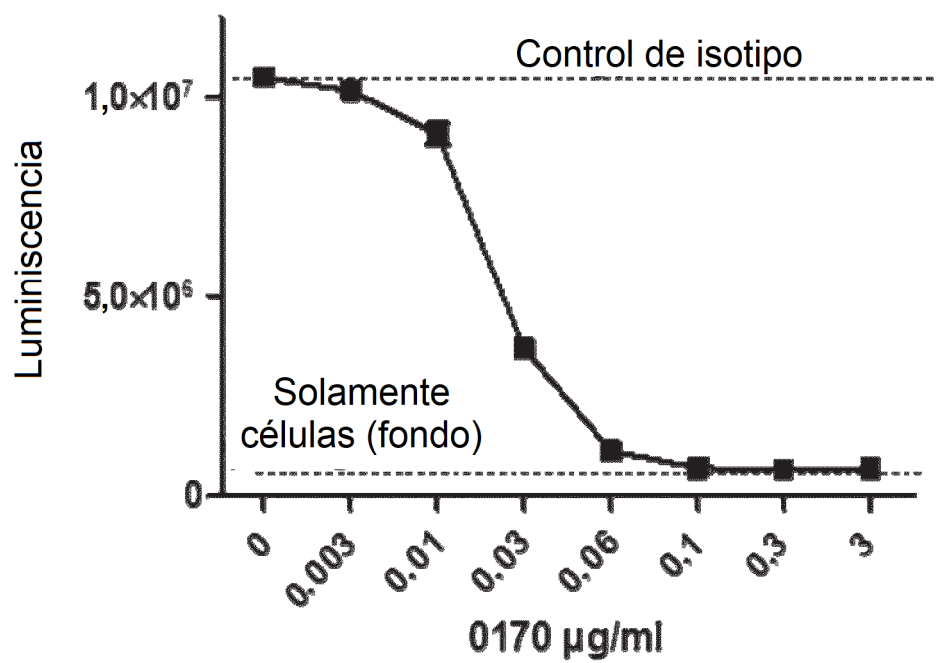


Fig. 10

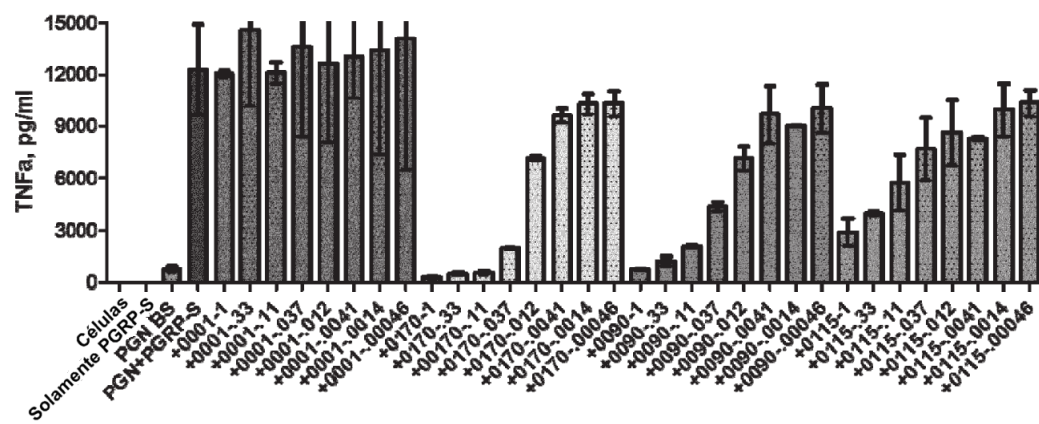


Fig. 11

	2	3	4	5	6	7
	789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456					
TREM-1 humano	ELRA	A T K L	TEEKYE L	KEGQTL D	VKCDY T	LEK F
TREM-1 cyno		T T E L	TEEKYE Y	KEGQTL E	VKCDY A	LEK Y
	:*.*****.*****:*****:***:*.*.*****: :*:*** ** *****:*					
	8	9	10	11	12	13
	789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456					
TREM-1 humano	SHPVQVGRIT	I L E D Y	H D H	R V R M V	NLQVEDSGLYQCVIYQ P	P K E P H M L F D R I R L V V T K G
TREM-1 cyno	SHPVQVGRIT	T L E D Y	P D H G L L	Q V Q M T	NLQVEDSGLYQCVIYQ H	P K E S H V L F N P I C L V V T K G
	*****.****.*****.*.*.*****.*****.***.*:***: * *****					
	14	15	16	17	18	19
	789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456					
TREM-1 humano	F S G T P G S	N E N S T Q N V Y	K I P T T T K A L	C P L Y T S P R T V T Q A P P K S T A D V S T P D S E I N L T N V T		
TREM-1 cyno	S S G T P G S	S E N S T Q N V Y	R T P S T T A K A L	G P R Y T S P R T V T Q A P P E S T V V S T P G S E I N L T N V T		
	*****.*****.*.*.***:*** * *****.***.****.*****					
	20					
	7890					
TREM-1 humano	DIIR					
TREM-1 cyno	DIIR					
