

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 039**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04817634 .1**
- 96 Fecha de presentación: **10.12.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1711531**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Anticuerpos anti-TLR4/MD-2 neutralizantes y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:
10.12.2003 US 528811 P
10.12.2003 US 528812 P
10.12.2003 US 528962 P

73 Titular/es:
NovImmune SA
14 ch. Des AulxPlan-Les-Ouates
1228 , CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

72 Inventor/es:
ELSON, Greg, Christopher, Andrew

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

ES 2 382 039 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 anti-TLR4/MD-2 neutralizantes y métodos de uso de los mismos.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere generalmente a la generación de anticuerpos monoclonales neutralizantes y, en particular, a anticuerpos monoclonales que reconocen el complejo receptor de tipo Toll 4/receptor de MD-2, a anticuerpos monoclonales que reconocen tanto el complejo receptor de tipo Toll 4/receptor de MD-2 como el receptor de tipo Toll 4 cuando no está complejado con MD-2 y a métodos de uso de los anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos. Esta invención también se refiere a proteínas quiméricas solubles, a métodos de expresión y purificación de proteínas quiméricas solubles y a métodos de uso de proteínas quiméricas solubles como agentes terapéuticos, en ensayos de selección y en la producción de anticuerpos.

15 Antecedentes de la Invención

Los receptores Toll, descubiertos por primera vez en *Drosophila*, son proteínas transmembrana de tipo I que tienen repeticiones ricas en leucina (LRR) en la parte extracelular de la proteína, y uno o dos dominios ricos en cisteína. Los homólogos en mamíferos de los receptores Toll de *Drosophila* se conocen como "receptores de tipo Toll" (TLR). Los TLR desempeñan un papel en la inmunidad innata reconociendo partículas microbianas y activando células inmunitarias contra la fuente de estas partículas microbianas.

Actualmente, se han identificado diez tipos de receptores de tipo Toll en seres humanos, TLR 1-10. Estos TLR se caracterizan por la homología de sus dominios intracelulares con respecto a los del receptor de IL-1, y por la presencia de repeticiones ricas en leucina extracelulares. Los diferentes tipos de TLR se activan por diferentes tipos de partículas microbianas. Por ejemplo, TLR4 se activa principalmente por lipopolisacárido (LPS), mientras de TLR2 se activa por ácido lipoteicoico (LTA), lipoarabinomano (LAM); lipoproteína (BLP) y peptidoglicanos (PGN). También se han identificado homólogos del receptor Toll, tales como RP105.

Se ha identificado y caracterizado la proteína de diferenciación mieloide 2 (MD-2), una proteína auxiliar de TLR4. Se ha hallado que esta proteína interacciona directamente con TLR4, y MD-2 tiene la capacidad de permitir modificaciones postraduccionales de TLR4, así como facilitar su transporte a la superficie celular. TLR4 y MD-2 forman un complejo en la superficie celular.

El lipopolisacárido (LPS), un componente de bacterias gram-negativas, es una partícula microbiana que puede activar fuertemente el sistema inmunitario innato. LPS suministra señales a células inmunitarias mediante su receptor de múltiples cadenas, que comprende el complejo TLR4/MD-2 como componente de señalización principal.

Por consiguiente, existe una necesidad de métodos y composiciones que modulen la señalización que está mediada por el complejo TLR4/MD-2.

Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados que reconocen el complejo receptor TLR4/MD-2, inhibiendo el anticuerpo monoclonal al menos el 50% de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en una disolución que comprende células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 humano cuando se añade dicho anticuerpo monoclonal a dicha disolución a una concentración de 10 µg/ml, en comparación con el nivel de producción de IL-8 inducida por LPS en ausencia de dicho anticuerpo monoclonal. En algunos casos, los anticuerpos monoclonales de la invención también reconocen TLR4 cuando no está complejado con D-2 (por ejemplo, proteínas TLR4 solubles, TLR4 expresado en la superficie celular). Los anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo incluyen 18H10, 16G7, 15C1 y 7E3.

Los anticuerpos de la invención pueden contener una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 12, 22 ó 32 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 7, 17, 27 ó 37. Preferiblemente, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o más idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DSYIH (SEQ ID NO: 3); WTDPENVNSIYDPRFQG (SEQ ID NO: 4); GYNGVYYAMDY (SEQ ID NO: 5); DYWIE (SEQ ID NO: 13); EILPGSGSTNYNEDFKD (SEQ ID NO:14); EERAYYFGY (SEQ ID NO: 15); GGYSWH (SEQ ID NO: 23); YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 24); KDPDGFY (SEQ ID NO: 25); TYNIGVG (SEQ ID NO: 33); HIWWNDNIYYNTVLKS (SEQ ID NO: 34); y MAEGRYDAMDY (SEQ ID NO: 35) y una cadena ligera con tres CDR que incluye una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o más idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SASSSVIYMH (SEQ ID NO: 8); RTYNLAS (SEQ ID NO: 9); HQWSSFPYT (SEQ ID

NO: 10); RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO: 18); RVSNRFS (SEQ ID NO: 19); LQVTHWPT (SEQ ID NO: 20); RASQSISDHLH (SEQ ID NO: 28); YASHAIS (SEQ ID NO: 29); QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 30); RASQDITNYLN (SEQ ID NO: 38); YTSKLHS (SEQ ID NO: 39); y QQGNTFPWT (SEQ ID NO: 40). El anticuerpo se une al complejo TLR4/MD-2, a TLR4 cuando no está complejo con MD-2, o a ambos.

5

La presente invención también proporciona los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de septicemia, lesión pulmonar inducida por ventilador, inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedad autoinmunitaria, osteoartritis o artritis reumatoide.

10

El sujeto que va a tratarse es, por ejemplo, un ser humano. El anticuerpo monoclonal se administra en una cantidad suficiente para tratar, prevenir o aliviar un síntoma asociado con la patología. La cantidad de anticuerpo monoclonal suficiente para tratar o prevenir la patología en el sujeto es, por ejemplo, una cantidad que es suficiente para reducir la producción de IL-8 inducida por LPS. Tal como se usa en el presente documento, el término "reducción" se refiere a una disminución de la producción de IL-8 en presencia de un anticuerpo monoclonal de la invención, siendo la producción, por ejemplo, la producción de IL-8 local (por ejemplo, en un sitio de tejido inflamado) o la producción de IL-8 sistémica. La producción de IL-8 inducida por LPS disminuye cuando el nivel de producción de IL-8 en presencia de un anticuerpo monoclonal de la invención es superior o igual al 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% inferior a un nivel control de producción de IL-8 (es decir, el nivel de producción de IL-8 en ausencia del anticuerpo monoclonal). El nivel de producción de IL-8 se mide, por ejemplo, usando la sangre completa humana o los ensayos celulares de HEK293 transfectadas con huTLR4/MD2 descritos en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de producción de IL-8 puede medirse usando una variedad de ensayos, incluyendo, por ejemplo, kits de ELISA disponibles comercialmente.

15

20

25

Los anticuerpos monoclonales de la invención son para su uso en el tratamiento de una patología seleccionada de septicemia, lesión pulmonar inducida por ventilador, inflamación aguda, inflamación crónica (por ejemplo, inflamación crónica asociada con estados alérgicos y asma), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, EII y aterosclerosis) y trastornos inducidos por factores de estrés solubles endógenos (por ejemplo, Hsp60, fibronectina, heparán sulfato, hialuronano, gp96, β -defensina-2 y proteína tensioactiva A), trastornos inducidos por factores de estrés solubles endógenos que son osteoartritis y artritis reumatoide. También pueden producirse patologías asociadas con estrés mecánico en sujetos y pacientes colocados en respiradores, ventiladores y otros dispositivos de asistencia respiratoria. Tales patologías incluyen, por ejemplo, lesión pulmonar inducida por ventilador ("LPIV"), también denominada lesión pulmonar asociada a ventilación ("LPAV").

30

35

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y un portador. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

40

También se dan a conocer proteínas del receptor Toll quiméricas solubles (también denominadas en el presente documento proteínas del receptor de tipo Toll), métodos para expresar proteínas del receptor Toll y métodos para purificar tales proteínas en una forma soluble.

45

En particular, se dan a conocer polipéptidos quiméricos en los que un polipéptido del receptor de tipo Toll, o un derivado biológicamente activo del mismo, está operativamente unido a polipéptido auxiliar MD, o un derivado biológicamente activo del mismo. El polipéptido del receptor de tipo Toll es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en TLR 1-10 y RP 105.

50

El polipéptido auxiliar MD es, por ejemplo, MD-1 o MD-2. El polipéptido del receptor de tipo Toll, en algunos casos, está operativamente unido al polipéptido auxiliar MD usando un ligador de glicina-serina flexible, que hace que el receptor Toll sea tanto estable durante la expresión como soluble durante la purificación. Por ejemplo, un polipéptido quimérico de la invención incluye la parte extracelular de un receptor Toll fusionada en su extremo C terminal al extremo N terminal de una proteína MD madura (es decir, MD-1 o MD-2) mediante un ligador de glicina-serina flexible.

55

También se dan a conocer métodos para producir proteínas de fusión quiméricas solubles acoplado un polipéptido del receptor de tipo Toll, o un derivado biológicamente activo del mismo, a un polipéptido auxiliar MD, o un derivado biológicamente activo del mismo. Se dan a conocer métodos para producir proteínas de fusión quiméricas solubles construyendo un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido del receptor de tipo Toll (o un derivado biológicamente activo del mismo) acoplado a una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido auxiliar MD (o un derivado biológicamente activo del mismo); transfectando una célula con este vector; cultivando la célula en condiciones que permiten la producción de una proteína de fusión que tiene un polipéptido del receptor de tipo Toll acoplado a un polipéptido auxiliar MD; y aislando esa proteína de fusión. El polipéptido auxiliar MD es, por ejemplo, MD-1 o MD-2, y el polipéptido del receptor de tipo Toll puede ser un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en TLR 1-10 y RP105. El polipéptido del receptor de tipo Toll está operativamente unido al polipéptido auxiliar MD mediante un ligador de glicina-serina flexible, que hace que el

60

receptor Toll sea tanto estable durante la expresión como soluble durante la purificación.

En el presente documento se dan a conocer métodos de tratamiento o prevención de patologías asociadas con función aberrante del receptor de tipo Toll, o de alivio de un síntoma asociado con estas patologías, administrando un polipéptido quimérico soluble de la invención a un sujeto en el que se desea tal tratamiento o prevención o alivio en una cantidad suficiente para tratar o prevenir o aliviar la patología, o un síntoma de la misma, en el sujeto. El sujeto que va a tratarse es, por ejemplo, un ser humano. La cantidad de polipéptido quimérico soluble suficiente para tratar o prevenir la patología en el sujeto es una cantidad que es suficiente para modular (por ejemplo, reducir o impedir) la activación de un receptor de tipo Toll en el sujeto que va a tratarse. La activación de un receptor Toll se reduce o disminuye cuando el nivel de activación del receptor Toll en presencia de una proteína quimérica de la invención es superior o igual al 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% inferior que un nivel control de activación del receptor de tipo Toll (es decir, el nivel de activación en ausencia de la proteína quimérica). El nivel de activación del receptor Toll se mide usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el nivel de activación de TLR4 puede medirse detectando el nivel de producción de IL-8 inducida por LPS. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de activación del receptor Toll también puede medirse, por ejemplo, detectando la activación, si hubiera alguna, de NF-kappa B o JNK (cinasa terminal c-jun), que inicia la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1-alfa, IL1-beta, IL6 y TNF-alfa). La activación de JNK y/o NF-kappa B puede detectarse midiendo los niveles de una o más citocinas proinflamatorias.

La patología que va a tratarse puede ser septicemia, inflamación aguda, inflamación crónica o una enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, la patología puede ser una cualquiera de una variedad de tipos de artritis.

También se dan a conocer anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a los polipéptidos quiméricos solubles de la invención, tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o anticuerpos humanizados.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un polipéptido quimérico soluble tal como se describió anteriormente y un portador, y/o un anticuerpo de la invención y un portador. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

También se dan a conocer métodos de selección de un ligando que se une a receptor de tipo Toll y modula la actividad del receptor de tipo Toll. Según estos métodos, estos ligandos se identifican proporcionando un polipéptido quimérico de la invención que tiene una propiedad o función que puede atribuirse a ese polipéptido; poniendo en contacto el polipéptido quimérico con un compuesto candidato; y determinando si el compuesto candidato altera la propiedad o función que puede atribuirse al polipéptido, en los que una alteración en la propiedad o función que puede atribuirse al polipéptido en presencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un ligando que modula la actividad del receptor de tipo Toll.

Un experto en la técnica apreciará que los polipéptidos quiméricos dados a conocer en el presente documento y los anticuerpos de la invención tienen una variedad de usos. Por ejemplo, las proteínas quiméricas se usan como agentes terapéuticos para impedir la activación de los TLR en trastornos tales como, por ejemplo, septicemia, inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedades autoinmunitarias y diversas formas de artritis. Las proteínas quiméricas también se usan como inmunógenos en métodos más eficaces de generación de anticuerpos anti-TLR de unión y bloqueantes, y/o estos polipéptidos quiméricos pueden usarse como reactivos en ensayos que seleccionan moléculas de unión y bloqueantes de pequeño peso molecular de la actividad de TLR. Las proteínas quiméricas dadas a conocer en el presente documento y/o anticuerpos de la invención también se usan como reactivos en kits de diagnóstico o como herramientas de diagnóstico, o estas proteínas quiméricas y/o anticuerpos pueden usarse en ensayos de competición para generar reactivos terapéuticos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que representa la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención, 18H10, al complejo TLR4/MD-2. La especificidad de unión se muestra mediante citometría de flujo usando células transfectadas con TLR4/MD-2 o transfectadas de manera simulada. Los resultados usando células transfectadas de manera simulada se muestran en el gráfico relleno (izquierda), mientras que los resultados usando las células transfectadas con TLR4/MD-2 se muestran en el gráfico de contorno (derecha).

La figura 2 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el anticuerpo monoclonal 18H10. Se incubaron las células con o bien mui8H10, HTA 125 (un AcM no bloqueante anti-TLR4 humano disponible comercialmente) o bien un control de anticuerpo a las concentraciones indicadas y posteriormente se incubaron con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS.

- La figura 3 es una serie de gráficos que representan la inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana mediante el anticuerpo monoclonal 18H10. Se extrajo sangre completa de 3 voluntarios sanos, se trató con heparina y se diluyó 1:4 en medio RPMI. Se añadieron los siguientes anticuerpos a las concentraciones indicadas: anticuerpo monoclonal de control; HTA125 y 18H10. Se añadió posteriormente LPS para una concentración final de 10 ng/ml, y se midieron los niveles de IL-8 6 horas tras el tratamiento con LPS.
- La figura 4 es una serie de gráficos que representan la especificidad del anticuerpo monoclonal 18H10 para MD-2. La especificidad del anticuerpo 18H10 se muestra mediante análisis de citometría de flujo de células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con o bien TLR4 humano o bien MD-2 humana (paneles A, E y J); TLR4 de conejo y MD-2 de conejo (paneles B, F y K); TLR4 humano y MD-2 de conejo (paneles C, G y L); o TLR4 de conejo y MD-2 humana (paneles D, H y I). Se incubaron las células con o bien anticuerpo α -FLAG™ (para detectar la expresión de TLR4); anticuerpo α -C-myc (para detectar la expresión de MD-2) o el anticuerpo monoclonal 18H10, seguido por anticuerpo α -(H+L) de ratón acoplado a APC.
- La figura 5A es un gráfico que demuestra la falta de especificidad de 18H10 por MD-2 soluble recombinante purificada de sobrenadantes de células de insecto infectadas con baculovirus tal como se determina mediante ELISA. Se recubren directamente con proteína placas de 96 pocillos (5 μ g/ml) seguido por AcM purificado a la concentración indicada y anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L)-HRP.
- La figura 5B es un gráfico que demuestra que MD-2 debe estar asociada con TLR4 para que el anticuerpo 18H10 la reconozca. Se incubaron lisados (panel 1, es decir, panel superior) o sobrenadantes (panel 2, es decir, panel inferior) de células HEK 293, transfectadas de manera transitoria según se indica, en pocillos recubiertos con anticuerpo anti-FLAG M2. Se detectó la unión de una forma biotinilada de 18H10 usando estreptavidina-HRP. 12D4 biotinilado (un AcM anti-TLR4) con estreptavidina-HRP o un Ac policlonal de conejo generado contra MD-2 soluble con un anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP controló la presencia de TLR4 y MD-2 respectivamente. En este experimento, TLR4 tenía una etiqueta FLAG en el extremo N terminal y se expresó usando el vector pCND3.1 (-)hygro (Invitrogen). MD-2 tenía etiquetas de histidina 6x y FLAG en el extremo C terminal y se expresó usando el vector pCND3 (Invitrogen). Las células simuladas se transfectaron con plásmido vacío.
- Las figuras 6A-6F son una serie de ilustraciones que representan la secuencia de nucleótidos de VH (SEQ ID NO: 1) (figura 6A), la secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO: 2) (figura 6B), la secuencia de nucleótidos de VL (SEQ ID NO: 6) (figura 6D) y la secuencia de aminoácidos de VL (SEQ ID NO: 7) para 18H10 (figura 6E). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH (SEQ ID NO: 3, 4 y 5) (figura 6C) y las CDR de VL (SEQ ID NO: 8, 9 y 10) (figura 6F) se resaltan en el texto en cursiva, subrayado en las figuras 6B y 6E.
- La figura 7 es un gráfico que representa que la secuencia de nucleótidos de VL y VH de 18H10 expresado como un AcM quimérico ("18H10 quimérico") puede unirse específicamente al complejo TLR4/MD-2 humano en la superficie de células CHO transfectadas. La unión del AcM a las células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 se muestra mediante citometría de flujo usando 18H10 quimérico o un AcM de control de isotipo coincidente a las concentraciones indicadas.
- La figura 8 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el AcM 18H10 quimérico. Se incubaron las células con 18H10, o 18H10 quimérico a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS. La inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS mediante el 18H10 quimérico fue similar a la inhibición mediante el AcM 18H10 de ratón de la invención.
- La figura 9 es un gráfico que representa la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención, 16G7, al complejo TLR4/MD-2. La especificidad de unión se muestra mediante citometría de flujo usando células transfectadas de manera simulada o transfectadas con TLR4/MD-2. Los resultados usando células transfectadas de manera simulada se muestran en el gráfico relleno (izquierda), mientras que los resultados usando células transfectadas con TLR4/MD-2 se muestran en el gráfico de contorno (derecha).
- La figura 10 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el anticuerpo monoclonal 16G7. Se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal 16G7, el AcM anti-TLR4 HTA 125 o un control de anticuerpo a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS.
- La figura 11 es una serie de gráficos que representan la inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana mediante el anticuerpo monoclonal 16G7. Se extrajo sangre completa de 3 voluntarios sanos, se trató con heparina y se diluyó 1:4 en medio RPMI. Se añadieron los siguientes anticuerpos a las concentraciones indicadas: control de isotipo coincidente; HTA125 (anticuerpo monoclonal no bloqueante anti-TLR4

humano); 16G7 y 28C5 (anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD14 humano). Posteriormente, se añadió LPS para una concentración final de 10 ng/ml.

5 La figura 12 es una serie de gráficos que representan la especificidad del anticuerpo monoclonal 16G7 para TLR4. Se muestra la especificidad del anticuerpo 16G7 mediante análisis de citometría de flujo de células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con o bien TLR4 de conejo y MD-2 de conejo (paneles A, E y I); TLR4 humano y MD-2 humana (paneles B, F y J); TLR4 de conejo y MD-2 humana (paneles C, G y K); o bien TLR4 humano y MD-2 de conejo (paneles D, H y L). Se incubaron las células con o bien anticuerpo α -FLAG™ (para detectar la expresión de TLR4); anticuerpo α -C-myc (para detectar la expresión de MD-2) o bien el anticuerpo monoclonal 16G7, seguido por un anticuerpo α -ratón (H+L) acoplado a APC.

15 Las figuras 13A-13F son una serie de ilustraciones que representan la secuencia de nucleótidos de VH (SEQ ID NO: 11) (figura 13A), la secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO: 12) (figura 13B), la secuencia de nucleótidos de VL (SEQ ID NO: 16) (figura 13D) y la secuencia de aminoácidos de VL (SEQ ID NO: 17) (figura 13E) para 16G7. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH (SEQ ID NO: 13, 14 y 15) (figura 13C) y las CDR de VL (SEQ ID NO: 18, 19 y 20) (figura 13F) se resaltan en el texto en cursiva, subrayado en las figuras 13B y 13E.

20 La figura 14 es un gráfico que representa la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención, 15C1, al complejo TLR4/MD-2. Se muestra la especificidad de unión mediante citometría de flujo usando células transfectadas con TLR4/MD-2 o transfectadas de manera simulada. Los resultados usando células transfectadas de manera simulada se muestran en el gráfico relleno (izquierda), mientras que los resultados usando células transfectadas con TLR4/MD-2 se muestran como en el gráfico de contorno (derecha).

25 La figura 15 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el anticuerpo monoclonal 15C1. Se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal 15C1, HTA 125 (anticuerpo monoclonal no bloqueante anti-TLR4 humano) y un control de isotipo coincidente (IgG1) a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS.

30 La figura 16 es una serie de gráficos que representan la inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana mediante el anticuerpo monoclonal 15C1. Se extrajo sangre completa de 3 voluntarios sanos, se trató con heparina y se diluyó 1:4 en medio RPMI. Se añadieron los siguientes anticuerpos a las concentraciones indicadas: control de isotipo coincidente (IgG1); HTA125 (anticuerpo monoclonal no bloqueante anti-TLR4 humano); 15C1 y 28C5 (anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD14 humano). Posteriormente, se añadió LPS para una concentración final de 10 ng/ml.

40 La figura 17 es una serie de gráficos que representan la especificidad del anticuerpo monoclonal 15C1 para TLR4. La especificidad del anticuerpo 15C1 se muestra mediante análisis de citometría de flujo de células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con o bien vector simulado, es decir, vector vacío (panel A), TLR4 humano (panel B), TLR4 humano y MD-2 humana (panel C), TLR4 de conejo y MD-2 de conejo (panel D), TLR4 humano y MD-2 de conejo (panel E), o bien TLR4 de conejo y MD-2 humana (panel F). Se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal 15C1 (10 μ g/ml), seguido por anticuerpo α -ratón (H+L) acoplado a APC.

45 Las figuras 18A-18F son una serie de ilustraciones que representan la secuencia de nucleótidos de VH (SEQ ID NO: 21) (figura 18A), la secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO: 22) (figura 18B), la secuencia de nucleótidos de VL (SEQ ID NO: 26) (figura 18D), y la secuencia de aminoácidos de VL (SEQ ID NO: 27) (figura 18E) para 15C1. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH (SEQ ID NO: 23, 24 y 25) (figura 18C) y las CDR de VL (SEQ ID NO: 28, 29 y 30) (figura 18F) se resaltan en el texto en cursiva, subrayado en las figuras 18B y 18E.

50 La figura 19 es un gráfico que representa que la secuencia de nucleótidos de VH y VL de 15C1 expresada como un AcM quimérico ("15C1 quimérico") puede unirse específicamente al complejo TLR4/MD-2 humano en la superficie de células CHO transfectadas. Se muestra la unión del AcM al complejo TLR4/MD-2 mediante citometría de flujo usando 15C1 quimérico o un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente a la concentración indicada.

55 La figura 20 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el AcM 15C1 quimérico. Se incubaron las células con 15C1 o 15C1 quimérico a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS. La inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS mediante el 15C1 quimérico fue similar a la inhibición por el AcM 15C1 de ratón de la invención.

60 La figura 21 es un gráfico que representa la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención, 7E3, al complejo TLR4/MD-2. La especificidad de la unión se muestra mediante citometría de flujo usando células transfectadas con TLR4/MD-2 o transfectadas de manera simulada. Los resultados usando células transfectadas de manera simulada

se muestran en el gráfico relleno (izquierda), mientras que los resultados usando células transfectadas con TLR4/MD-2 se muestran como en el gráfico de contorno (derecha).

5 La figura 22 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el anticuerpo monoclonal 7E3. Se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal 7E3, HTA 125 (anticuerpo monoclonal no bloqueante anti-TLR4 humano) y un control de isotipo coincidente (IgG1) a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS.

10 La figura 23 es una serie de gráficos que representan la inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana por el anticuerpo monoclonal 7E3. Se extrajo sangre completa de 3 voluntarios sanos, se trató con heparina y se diluyó 1:4 en medio RPMI. Se añadieron los siguientes anticuerpos a las concentraciones indicadas: control de isotipo coincidente (IgG1); HTA125 (anticuerpo monoclonal no bloqueante anti-TLR4 humano); 7E3 y 28C5 (anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD14 humano). Posteriormente, se añadió LPS para una
15 concentración final de 10 ng/ml.

La figura 24 es una serie de gráficos que representan la especificidad del anticuerpo monoclonal 7E3 para el complejo TLR4/MD-2. La especificidad del anticuerpo 7E3 se muestra mediante análisis de citometría de flujo de células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con o bien vector simulado (panel A), TLR4 humano (panel B),
20 TLR4 humano y MD-2 humana (panel C), TLR4 de conejo y MD-2 de conejo (panel D), TLR4 humano y MD-2 de conejo (panel E), o bien TLR4 de conejo y MD-2 humana (panel F). Se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal 7E3 (10 µg/ml), seguido por un anticuerpo α -ratón (H+L) acoplado a APC.

Las figuras 25A-25F son una serie de ilustraciones que representan la secuencia de nucleótidos de VH (SEQ ID NO: 31) (figura 25A), la secuencia de aminoácidos de VH (SEQ ID NO: 32) (figura 25B), la secuencia de nucleótidos de VL (SEQ ID NO: 36) (figura 25D) y la secuencia de aminoácidos de VL (SEQ ID NO: 37) (figura 25E) para 7E3. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH (SEQ ID NO: 33, 34 y 35) (figura 25C) y las CDR de VL (SEQ ID NO: 38, 39 y 40) (figura 25F) se resaltan en el texto en cursiva subrayado en las figuras 25B y 25E.
25

30 La figura 26 es un gráfico que ilustra que la secuencia de nucleótidos de VH y VL de 7E3 expresada como un AcM quimérico ("7E3 quimérico") puede unirse específicamente al complejo TLR4/MD-2 humano en la superficie de células CHO transfectadas. La unión del anticuerpo monoclonal a células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 se muestra mediante citometría de flujo usando 7E3 quimérico o un AcM de control de isotipo coincidente a las concentraciones indicadas.
35

La figura 27 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 mediante el AcM 7E3 quimérico. Se incubaron las células con 7E3 quimérico o un control de AcM de isotipo coincidente a las concentraciones indicadas y se incubaron posteriormente con LPS (15 ng/ml). Se evaluaron los niveles de IL-8 16 horas tras el tratamiento con LPS.
40

La figura 28 es una ilustración que representa la construcción de un ADNc de proteína de fusión TLR4/MD-2 según la presente invención.

45 La figura 29 es una ilustración que representa la expresión de una proteína quimérica TLR4/MD-2 de la invención en lisados y sobrenadante de células Sf9.

La figura 30 es una ilustración que representa la purificación de una proteína quimérica TLR4/MD-2 según la invención a partir de lisados de células Sf9 infectadas.

50 La figura 31 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) usando una proteína TLR4/MD-2 quimérica soluble según la presente invención.

La figura 32A ilustra una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína auxiliar MD-1 (SEQ ID NO: 41).

55 La figura 32B representa una secuencia de aminoácidos de una proteína auxiliar MD-1 madura en una realización preferida de la invención (SEQ ID NO: 42).

La figura 33A ilustra una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína auxiliar MD-2 (SEQ ID NO: 43).

60 La figura 33B representa una secuencia de aminoácidos de una proteína auxiliar MD-2 madura (SEQ ID NO: 44).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que neutralizan la activación del complejo receptor TLR4/MD-2. En particular, la invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a un complejo receptor TLR4/MD-2 humano en la que el anticuerpo monoclonal inhibe al menos el 50% de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en una disolución que comprende células HEK293 humanas transfectadas con TLR4/MD-2 humano en la que dicho anticuerpo se añade a dicha disolución a una concentración de 10 ng/ml, en comparación con el nivel de producción de IL-8 inducida por LPS en ausencia de dicho anticuerpo monoclonal. Además, algunos anticuerpos monoclonales de la invención también reconocen TLR4 cuando no está complejado con MD-2. Los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo 18H10 (figuras 6A-6F), el anticuerpo 16G7 (figuras 13A-13F), el anticuerpo 15Cl (figuras 18A-18F) y el anticuerpo 7E3 (figuras 25A-25F).

También se dan a conocer proteínas del receptor Toll quiméricas solubles (también denominadas en el presente documento proteínas del receptor de tipo Toll), métodos para expresar proteínas del receptor Toll y métodos para purificar tales proteínas en forma soluble. Las proteínas quiméricas son útiles, por ejemplo, en la generación de anticuerpos.

Los TLR reconocen partes microbianas y activan células inmunitarias contra la fuente de estas partículas microbianas. (Véase Takeda *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 21: 335-76 (2003)). Se ha mostrado que TLR4 y MD-2 forman un complejo en la superficie celular, y la presencia de MD-2 parece ser esencial para receptividad de TLR4 a diversos ligandos, incluyendo LPS. LPS es un glicolípido de la membrana externa de bacterias gram-negativas que puede activar fuertemente el sistema inmunitario innato. Se ha implicado a LPS como uno de los principales factores que activan el sistema inmunitario durante la inflamación generalizada grave que resulta de la infección por gram-negativos. (Lakhani *et al.*, Curr. Opin. Pediatr. 15: 278-282 (2003)).

LPS suministra señales a las células inmunitarias mediante su receptor de múltiples cadenas en el que el complejo TLR4/MD-2 es el componente de señalización principal. Se ha mostrado que LPS ejerce sus efectos sobre el sistema inmunitario mediante señalización a través de TLR4. LPS se une rápidamente a la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en el torrente sanguíneo, y de esta forma el LPS interacciona con la proteína de superficie celular anclada a GPI CD14. Entonces, LPS se transfiere a TLR4, que transduce una señal de activación intracelular. Se ha encontrado que otra proteína, MD-2, es necesaria para que se produzca la transducción de señales mediante TLR4. MD-2 interacciona directamente con TLR4 y desempeña un papel importante en su modificación postraduccional y tráfico intracelular. Además, se ha mostrado que MD-2 se une directamente a LPS, lo que demuestra la importancia de esta proteína auxiliar en el complejo de receptor de LPS. (Véase Miyake K., Int. Immunopharmacol. 3:119-128 (2003)).

Por consiguiente, la neutralización de la señalización de LPS mediada por el complejo TLR4/MD-2 es una posible estrategia terapéutica en el tratamiento de trastornos tales como, por ejemplo, inflamación sistémica aguda y septicemia inducida por infección bacteriana gram-negativa.

Definiciones:

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados con respecto a la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que requiera lo contrario por el contexto, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en singular incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas con respecto a, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de oligo y polinucleótidos descritas en el presente documento se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o tal como se logran comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas con respecto a, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química farmacéutica y médica descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que tienen los siguientes significados:

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a (inmunoreacciona con) un antígeno. Por “se une específicamente a” o “inmunoreacciona con” o “se une inmunoespecíficamente a” quiere decirse que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos ni se une a una afinidad mucho más baja ($K_d > 10^{-6}$). Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, Acd (anticuerpo de dominio), cadena sencilla, fragmentos F_{ab} , F_{ab}' y $F_{(ab)2}$, scFv, y una biblioteca de expresión de F_{ab} .

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencia entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases tiene subclases también, tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

La expresión “anticuerpo monoclonal” (AcM) o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena ligera única y un producto génico de cadena pesada única. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los AcM contienen un sitio de unión a antígeno que pueden inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por el mismo.

La expresión “sitio de unión a antígeno”, o “parte de unión” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por los residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales (“V”) de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas “regiones hipervariables”, están intercaladas entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como “regiones de entramado” o “FR”. Por tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural entre, y adyacentes a, las regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen en relación entre sí en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan “regiones determinantes de complementariedad”, o “CDR”. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. El término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos contra los péptidos N-terminales o C-terminales de un polipéptido. Un anticuerpo se dice que se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “unión inmunológica” y “propiedades de unión inmunológica” se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica puede expresarse en cuanto a la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados puede cuantificarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Un método de este tipo implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo de sitio de unión a antígeno/antígeno, en el que estas velocidades dependen de las concentraciones de las parejas de complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen por igual en la velocidad en ambas direcciones. Por tanto, tanto la “constante de asociación (*on rate constant*)” (K_{on}) y la “constante de disociación (*off rate constant*)” (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación.

(Véase Nature 361:186-87 (1993)). La razón de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, generalmente, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente al complejo receptor de tipo Toll 4 (TLR4)/MD-2 o a TLR4 cuando no está complejo con MD-2, cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y lo más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , tal como se mide mediante ensayos tales como ensayos de unión a radioligandos o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

La expresión "polinucleótido aislado" tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de ADNc genómico, o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

La expresión "proteína aislada" a la que se hace referencia en el presente documento significa una proteína de ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de las mismas, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) la expresa una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a una proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia polipeptídica. Por tanto, los fragmentos de una proteína nativa, y análogos, son especies del género del polipéptido. Los polipéptidos preferidos según la invención comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana representadas en las figuras 6B, 13B, 18B y 25B y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera humana representadas en las figuras 6E, 13E, 18 y 25, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de las mismas.

La expresión "que se produce de manera natural" tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionadamente en el laboratorio o se produce de manera natural por lo demás.

La expresión "operativamente unido" tal como se usa en el presente documento se refiere a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de una manera prevista. Una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

La expresión "secuencia de control" tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difieren dependiendo del organismo huésped en procariontas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosómico y una secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión. El término "polinucleótido" tal como se le hace referencia en el presente documento significa un boro polimérico de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, o bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de cada tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

El término oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y nucleótidos modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o de 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son habitualmente monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención son o bien oligonucleótidos sentido o bien antisentido.

La expresión "oligonucleótidos que se producen de manera natural" a la que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" a la que se hace

referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “enlaces oligonucleotídicos” a la que se hace referencia en el presente documento incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotiato, fosforoditioato, fosforoselerloato, fosforodiselenoato, fosforoanilotiato, fosforaniladato, fosforomidato y similares. Véanse por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

La expresión “se hibrida selectivamente” a la que se hace referencia en el presente documento significa unir de manera detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos según la invención se hibridan selectivamente con hebras de ácidos nucleicos en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectivas tal como se conocen en la técnica y se comentan en el presente documento. Generalmente, la homología de secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos del 80%, y más normalmente con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85%, 90%, 95%, 99% y el 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa de sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando se alinean las dos secuencias para apareamiento máximo. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están apareándose) para maximizar el apareamiento, se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos siendo las más preferidas 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias proteicas (o secuencias polipeptídicas derivadas de las mismas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como se usa esta expresión en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de como máximo 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o mayor. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son más o igual al 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima usando el programa ALIGN. La expresión “corresponde a” se usa en el presente documento para querer decir que una secuencia de polinucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada de manera evolutiva) a la totalidad o a una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. En contraposición, la expresión “complementario a” se usa en el presente documento para querer decir que la secuencia complementaria es homóloga a la totalidad o a una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos “TATAC” corresponde a una secuencia de referencia “TATAC” y es complementaria a una secuencia de referencia “GTATA”.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótido o aminoácidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias, una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de una secuencia génica o ADNc de longitud completa facilitada en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica o ADNc completo. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, y con frecuencia al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Dado que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, una parte del polinucleótido completo o la secuencia de aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se realizan habitualmente comparando secuencias de las dos moléculas a lo largo de una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en los que una secuencia de polinucleótido o secuencia de aminoácidos puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en las que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin

Genetics versión 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de software de Geneworks, o MacVector), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el porcentaje de homología más alto a lo largo de la ventana de comparación) generada mediante los diversos métodos.

5

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótido o aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo o base de ácido nucleico idéntico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de polinucleótido o aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos del 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

20

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección a mano izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección a mano derecha es la dirección carboxilo-terminal, según el uso y la convención habitual.

35

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de las secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5', la dirección a mano izquierda de las secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción, las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5'", las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' en el transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

40

Tal como se aplica para polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95 por ciento y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento.

45

Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

50

Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxialifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspártico y asparagina-glutamina.

55

60

Tal como se comenta en el presente documento, se considera que variaciones minoritarias en las secuencias de

aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, el 90%, el 95% y lo más preferiblemente el 99%. En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxialifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio de entramado. Puede determinarse fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional sometiendo a ensayo la actividad específica del derivado polipeptídico. Se describen ensayos en detalle en el presente documento. Los expertos habituales en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Fragmentos amino y carboxilo terminales preferidos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales mediante comparación de los datos de secuencias de nucleótidos o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación informatizados para identificar motivos de secuencias o dominios de conformación de proteína pronosticados que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

Sustituciones de aminoácidos preferidas son aquéllas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta a la secuencia peptídica que se produce de manera natural. Por ejemplo, pueden prepararse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forman contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tener a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991).

El término "fragmento polipeptídico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxilo-terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce de manera natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Normalmente, los fragmentos son de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de largo, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de largo, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de largo, habitualmente al menos 50 aminoácidos de largo, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de largo. El término "análogo" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que están compuestos por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene unión específica al complejo TLR4/MD2 o TLR4 solo, en condiciones de unión adecuadas. Normalmente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia que se produce de manera natural. Los análogos normalmente son de al menos 20 aminoácidos de largo, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de largo o más largos, y con frecuencia son tan largos como un polipéptido que se produce de manera natural de longitud completa.

Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "compuestos miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber y Freidinger TINS pág.

392 (1985); y Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan con frecuencia con la ayuda de modelado molecular informatizado. Pueden usarse compuestos miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos sustituidos opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH₂--, CH(OH)CH₂-- y -CH₂SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "marcar" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos de biotínulo que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas situaciones, el marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa del rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos biotínulo, quimioluminiscentes, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo). En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. El término "fármaco o agente farmacéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición o compuesto químico que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Otros términos de química en el presente documento se usan según el uso convencional en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo en The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

La expresión "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o una evolución de un neoplasma en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa una especie objeto que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, 90%, 95% y el 99%. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) consistiendo la composición esencialmente en una especie macromolecular individual.

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de la invención tienen la capacidad de inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS. La inhibición se determina, por ejemplo, en los ensayos de sangre completa humana y de células HEK 293 transfectadas con huTLR4/MD2 descritos en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, los anticuerpos denominados en presente documento "18H10", "16G7", "15C1" y "7E3". El anticuerpo 18H10 reconoce el complejo TLR4/MD-2, pero no reconoce una proteína MD-2 cuando no está

complejada con TLR4. Los anticuerpos monoclonales 16G7, 15C1 y 7E3 reconocen el complejo TLR4/MD-2. 15C1 y 16G7 también reconocen TLR4 cuando no está complejado con MD-2.

5 En la invención también se incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal 18H10, 16G7, 15C1 y/o 7E3) determinando si el primero impide que este último se una al complejo TLR4/MD-2 o a TLR4 cuando no está complejado a MD-2. Si el anticuerpo monoclonal que va someterse a prueba compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, tal como se muestra mediante una
10 disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo, o a un epítipo estrechamente relacionado. Otra manera para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal de la invención con el complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 soluble (con la que es normalmente reactivo), y entonces añadir el anticuerpo monoclonal que está sometiéndose a prueba para
15 determinar si el anticuerpo monoclonal que está sometiéndose a prueba está inhibido en su capacidad de unirse al complejo TLR4/MD-2 o de unirse a TLR4 y TLR4 complejado con MD-2. Si el anticuerpo monoclonal que está sometiéndose a prueba está inhibido entonces, con toda probabilidad, tiene una especificidad epitópica igual o funcionalmente equivalente que el anticuerpo monoclonal de la invención. La selección de los anticuerpos monoclonales de la invención también puede llevarse a cabo midiendo la producción de IL-8 inducida por LPS y
20 determinando si el anticuerpo monoclonal de prueba puede neutralizar la producción de IL-8 inducida por LPS.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden usarse para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2, o frente a TLR4 cuando no está complejado a MD-2, o contra
25 derivados, fragmentos, análogos homólogos u ortólogos de los mismos. (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Los anticuerpos se purifican mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporciona principalmente la fracción de IgG de suero inmunitario. Posteriormente, o
30 alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de la misma, puede immortalizarse en una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de afinidad. La purificación de inmunoglobulinas se comenta, por ejemplo, en D. Wilkinson (*The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, 18H10, 16G7, 15C1 y 7E3) son anticuerpos monoclonales. Se
35 generan anticuerpos monoclonales que neutralizan la señalización por LPS que está mediada por el complejo TLR4/MD-2, por ejemplo, inmunizando ratones BALB/c con combinaciones de transfectantes celulares que expresan altos niveles de TLR4 y MD-2 en su superficie y una proteína quimérica soluble recombinante que comprende tanto TLR4 como MD-2 unidos mediante una secuencia de ligador flexible. Se examinan entonces hibridomas que resultan de fusiones de mieloma/células B, para determinar la reactividad frente a este complejo TLR4/MD-2.

40 Se preparan anticuerpos monoclonales, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza normalmente con un agente de inmunización para provocar los linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente de inmunización. Alternativamente, los
45 linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente de inmunización incluirá normalmente el antígeno proteico, un fragmento del mismo o una proteína de
50 fusión del mismo. Generalmente, o bien se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o bien se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Entonces, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovinas y de origen humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse
55 en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

60 Líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan expresión a alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse,

por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromioma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63)).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede entonces someterse a ensayo para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmuoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Además, en las aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno diana.

Tras identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y hacerse crecer mediante métodos convencionales. (Véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 4.816.567. El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que por lo demás no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Puede sustituirse un polipéptido distinto de inmunoglobulina de este tipo por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o pueden sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en los que la secuencia entera de tanto la cadena ligera como la cadena pesada, incluyendo las CDR, provienen de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en el presente documento. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, *et al.*, 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs., 77-96). Pueden utilizarse y producirse anticuerpos monoclonales usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs.77-96).

Además, también pueden producirse anticuerpos humanos usando técnicas adicionales, incluyendo bibliotecas de presentación en fago. (Véase Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 1 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). De manera similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulinas endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la observada en seres humanos en todos los sentidos, incluyendo reorganización génica, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en Marks *et al.*, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); y

Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Pueden producirse adicionalmente anticuerpos humanos usando animales no humanos transgénicos que se modifican de modo que producen anticuerpos completamente humanos en vez de anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la exposición a un antígeno. (Véase la publicación PCT WO94/02602). Los genes endógenos que codifican para las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en el huésped no humano se han incapacitado, y se insertan locus activos que codifican para inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanas en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas se obtiene entonces como progenie mediante cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos del complemento completo de las modificaciones. Un ejemplo de un animal no humano de este tipo es un ratón denominado Xenomouse™ tal como se da a conocer en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal tras la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente a partir de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los genes que codifican para las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv).

Un ejemplo de un método de producción de un huésped no humano, mostrado a modo de ejemplo como un ratón, que carece de la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena, se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.939.598. Puede obtenerse mediante un método, que incluye deleción de los genes del segmento J de al menos un locus de cadena pesada endógena en una célula madre embrionaria para impedir la reorganización del locus y para impedir la formación de un transcrito de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizado, efectuándose la deleción mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica para un marcador seleccionable; y produciendo a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica para el marcador seleccionable.

Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.916.771. Este método incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para una cadena ligera en otra célula huésped de mamífero, y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

En una mejora adicional de este procedimiento, se dan a conocer un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmunógeno, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al epítipo relevante con alta afinidad en la publicación PCT WO 99/53049.

El anticuerpo puede expresarse mediante un vector que contiene un segmento de ADN que codifica para el anticuerpo de cadena sencilla descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, pistola génica de ADN asistida por adyuvante, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos tales como los descritos en el documento WO 93/64701, que tienen un resto de direccionamiento (por ejemplo un ligando para un receptor de superficie celular), y resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), un vector viral (por ejemplo un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión tales como las descritas en el documento PCT/US 95/02140 (documento WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene un resto diana (por ejemplo un anticuerpo específico para una célula diana) y un resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, una protamina), plásmidos, fago, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de viruela tales como vectores de ortoviruela o viruela aviar, vectores de virus del herpes tales como un vector de virus del herpes simple I (VHS) (véanse Geller, A. I. *et al.*, J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., *et al.*, en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra) (1995); Geller, A. I. *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), vectores de adenovirus (véanse LeGal LaSalle *et al.*, Science, 259:988 (1993); Davidson, *et al.*, Nat. Genet 3: 219 (1993); Yang, *et al.*, J. Virol. 69:2004 (1995) y vectores de virus adenoasociados (véase Kaplitt, M. G. *et al.*, Nat. Genet. 8:148 (1994).

Los vectores virales de viruela introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores de virus de la viruela

- aviar dan como resultado sólo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados y vectores de virus del herpes simple (VHS) para introducir el ácido nucleico en células neurales. El vector de adenovirus da como resultado una expresión a más corto plazo (aproximadamente 2 meses) que virus adenoasociados (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corta que con vectores de VHS. El vector particular elegido dependerá de la célula diana y del estado que está tratándose. La introducción puede ser mediante técnicas convencionales, por ejemplo infección, transfección, transducción o transformación. Los ejemplos de modos de transferencia génica incluyen por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO_4 , DEAE-dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección de células y vectores virales.
- El vector puede emplearse para seleccionar como diana esencialmente a cualquier célula diana deseada. Por ejemplo, puede usarse inyección estereotáxica para dirigir los vectores (por ejemplo adenovirus, VHS) a una ubicación deseada. Adicionalmente, las partículas pueden suministrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión de minibomba, tal como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en flujo volumétrico, denominado convección, también ha demostrado ser eficaz en el suministro de moléculas grandes a zonas extendidas del cerebro y puede ser útil en el suministro del vector a la célula diana. (Véanse Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison *et al.*, Am. J. Physiol. 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que pueden usarse incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vía oral u otras vías de administración conocidas.
- Estos vectores pueden usarse para expresar grandes cantidades de anticuerpos que pueden usarse de una variedad de formas. Por ejemplo, para detectar la presencia del complejo TLR4/MD-2 y/o TLR4 en una muestra. El anticuerpo también puede usarse para tratar de unirse a o alterar la señalización relacionada con el complejo TLR4/MD-2.
- Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos frente a una proteína antigénica de la invención (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.946.778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de F_{ab} (véase por ejemplo, Huse, *et al.*, 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos F_{ab} monoclonales con la especificidad deseada por una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos frente a un antígeno proteico mediante técnicas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a: (i) un fragmento $F_{(ab)2}$ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento $F_{(ab)2}$; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v . La invención también incluye fragmentos F_v , F_{ab} , F_{ab}' y $F_{(ab)2}$ anti-complejo TLR4/MD2 o fragmentos anti-TLR4, anticuerpos anti-TLR4/MD2 o anti-TLR4 de cadena sencilla, anticuerpos anti-TLR4/MD2 o anti-TLR4 biespecíficos y anticuerpos anti-TLR4/MD2 o anti-TLR4 heteroconjugados.
- Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el complejo TLR4/MD2 y/o TLR4 cuando no está complejo con MD-2. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad de receptor de superficie celular.
- Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).
- Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la región bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse mediante ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera

del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s), en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas de aminoácidos grandes por pequeños (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímeros con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de $F(ab')_2$). Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinos e impedir la formación de disulfuro intramolecular. Los fragmentos de Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB entonces se vuelve a convertir en el Fab' -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Adicionalmente, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar e aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios de V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse con dos epítopos diferentes, originándose al menos uno de ellos en el antígeno proteico de la invención. Alternativamente, un brazo antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG ($Fc\gamma R$), tales como $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) y $Fc\gamma RIII$ (CD16) de modo que se centran los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos hasta células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos tienen en un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno proteico descrito en el presente documento y se une adicionalmente al factor tisular (TF).

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que tales anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (véase la patente estadounidense n.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (véanse los documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos

conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.676.980.

5 Puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de modo que se potencie, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante. Por ejemplo, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado
10 puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, puede modificarse mediante ingeniería un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede tener de ese modo capacidades potenciadas de ADCC y lisis del complemento. (Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

15 La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

20 Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no son de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

30 Se preparan conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*,
35 Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil-triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

40 Los expertos habituales en la técnica reconocerán que una gran variedad de posibles restos pueden acoplarse a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributiones to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (editores), Carger Press, Nueva York, (1989),

45 El acoplamiento puede conseguirse mediante cualquier reacción química que unirá las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus actividades respectivas. Esta unión puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. Sin embargo, la unión preferida es la unión covalente. La unión covalente puede lograrse o bien mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas proteicas, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden
50 incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino que, más bien, es a modo de ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véanse Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987)).

55 Se describen ligadores preferidos en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describen el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también, la patente estadounidense n.º 5.030.719, que describe el uso de un derivado de acetilhidrazida halogenado acoplado a un anticuerpo por medio de un ligador oligopeptídico. Ligadores particularmente preferidos incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida; (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-
60 (2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo (Pierce Chem. Co., Cat n.º 21651G); (iv) sulfo-LC-SPDP (6-[3-(2-piridilditio)-propianamida]hexanoato de sulfosuccinimidilo (Pierce Chem. Co. Cat. n.º 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem.

Co., Cat. n.º 24510) conjugado a EDC.

Los ligadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, conduciendo de ese modo a conjugados con propiedades fisicoquímicas distintas. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los ligadores que contienen éster de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el ligador SMPT contiene un enlace disulfuro con impedimento estérico, y puede formar conjugados con estabilidad aumentada. Las uniones disulfuro, son en general, menos estables que las demás uniones porque la unión disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. En particular, sulfo-NHS puede potenciar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tales como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes estadounidenses n.ºs 4.485.045 y 4.544.545. Se dan a conocer liposomas con tiempo de circulación aumentado en la patente estadounidense n.º 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas tal como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro.

Uso de anticuerpos contra el complejo TLR4/MD2 y anticuerpos contra TLR4

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la invención se administrará con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar una mejora de la transferencia, suministro, tolerancia y similares. Puede hallarse una multitud de formulaciones farmacéuticas apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en los tratamientos y las terapias según la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas en esos documentos para información adicional relacionada con las formulaciones, los excipientes y portadores bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo monoclonal de la invención, se usan para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmunitario. La presente invención también proporciona métodos de tratamiento o alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmunitario. Se lleva a cabo un régimen terapéutico identificando un sujeto, por ejemplo, un paciente humano que padece de (o corre el riesgo de desarrollar) un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, usando métodos convencionales.

Los anticuerpos de la invención, que pueden inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS, son herramientas terapéuticas útiles en el tratamiento de trastornos, tales como, por ejemplo, inflamación aguda y septicemia inducidas por productos microbianos (por ejemplo, LPS) y agravamientos que surgen de esta inflamación aguda, tales como, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma (véase O'Neill, Curr. Opin. Pharmacol. 3: 396-403 (2003)). Tales anticuerpos también son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias neurodegenerativas. (Lehnardt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8514-8519 (2003),).

Además, los anticuerpos de la invención son para su uso en el tratamiento de osteoartritis, y artritis reumatoide que están causadas por estrés mecánico, lo que a su vez, induce factores de "estrés" solubles endógenos que activan TLR4. El factor de estrés soluble endógeno incluye por ejemplo, Hsp60 (véase Ohashi *et al.*, J. Immunol. 164: 558-561 (2000)) y fibronectina (véase Okamura *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 10229-10233 (2001) y heparán sulfato,

hialuronano, gp96, [beta]-defensina-2 o proteína tensioactiva A (véase por ejemplo, Johnson *et al*, Crit. Rev. Immunol., 23(1-2): 15-44 (2003). Los anticuerpos de la invención también son para su uso en el tratamiento de lesión pulmonar inducida por ventilador ("LPIV"), también denominada lesión pulmonar asociada a ventilación ("LPAV").

5 La invención también proporciona anticuerpos tal como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de la inflamación crónica (por ejemplo, inflamación crónica asociada con estados alérgicos y asma), inflamación aguda y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, trastorno inflamatorio del intestino). También se contempla el tratamiento de la aterosclerosis (véase O'Neill, Curr. Opin. Pharmacol. 3: 396-403 (2003).

10 Los síntomas asociados con estos trastornos relacionados con el sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, malestar general, fiebre, dolor, con frecuencia localizado en la zona inflamada, rápida frecuencia de pulso, dolores o molestias articulares (artralgia), respiración rápida u otros patrones de respiración anómalos, escalofríos, confusión, desorientación, agitación, mareo, tos, disnea, infecciones pulmonares, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria, edema, aumento de peso, recaídas mucopurulentas, caquexia, sibilancias, cefalea y
15 síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno relacionado con el sistema inmunitario particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno relacionado con el sistema inmunitario indica que el anticuerpo confiere un beneficio clínico.

Los métodos para la selección de anticuerpos que presentan la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas dentro de la técnica.

25 Los anticuerpos dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 o frente a TLR4 cuando no está complejado a MD-2 (o un fragmento del mismo) pueden usarse en los métodos conocidos dentro de la técnica relacionada con la localización y/o cuantificación del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 (por ejemplo, para su uso en la medición de niveles del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en métodos de diagnóstico, para su uso en la obtención de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, se utilizan anticuerpos específicos para el complejo TLR4/MD-2, o TLR4, o derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contiene el anticuerpo derivado del dominio de unión a antígeno, como compuestos farmacológicamente activos (denominados a continuación en el presente documento "agentes terapéuticos").

35 Un anticuerpo específico para el complejo TLR4/MD-2 o TLR4 puede usarse para aislar el complejo TLR4/MD-2 o un polipéptido de TLR4 mediante técnicas convencionales, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Los anticuerpos dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 (o un fragmento de la misma) pueden usarse como diagnóstico para monitorizar los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar, por ejemplo, la eficacia de un régimen de
40 tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminescentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

50 Los anticuerpos de la invención, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y completamente humanos, pueden usarse como agentes terapéuticos. Tales agentes se emplearán generalmente para tratar o prevenir una enfermedad o patología asociada con una señalización de TLR4 aberrante en un sujeto. Una preparación de anticuerpos, preferiblemente una que tiene alta especificidad y alta afinidad para su antígeno diana, se administra al sujeto y tendrá generalmente un efecto debido a su unión con la diana. La administración del anticuerpo puede suprimir o inhibir o interferir con la función de señalización de la diana (por ejemplo, el complejo TLR4/MD-2). La administración del anticuerpo puede suprimir o inhibir o interferir con la unión de la diana (por ejemplo, TLR4) con un ligando endógeno (por ejemplo, TLR4 o la proteína auxiliar MD-2) a la que se une de manera natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une a la diana y neutraliza la producción de IL-8 inducida por LPS.

60 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se refiere generalmente a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Tal como se observó anteriormente, esto puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno diana que, en determinados casos, interfiere con el funcionamiento de la diana. La cantidad requerida que va administrarse dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo para su

antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que se reduce un anticuerpo administrado a partir del volumen libre que se administra a otro sujeto. Intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitativo, de desde aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden oscilar, por ejemplo, entre dos veces al día y una vez a la semana.

Los anticuerpos que se unen específicamente al complejo TLR4/MD-2 o a una proteína TLR4 o un fragmento de la misma pueden administrarse para el tratamiento de trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante en forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y las consideraciones implicados en la preparación de tales composiciones, así como una orientación en la elección de los componentes se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 19^a ed. (Alfonso R. Gennaro, *et al.*, editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide and Protein Drug Delivery (Advances in Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, Nueva York.

Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el menor fragmento inhibidor que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante la tecnología de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que esté tratándose, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, agente quimioterápico o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico). Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Un anticuerpo según la invención puede usarse como un agente para detectar la presencia del complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 (o un fragmento de proteína de la misma) en una muestra. Para tales usos, el anticuerpo puede contener un marcador detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab, scFv o F(ab)₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende englobar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que se une directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente y el marcaje de extremos de una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada de manera fluorescente. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. Está incluida dentro de la utilización de la expresión "muestra biológica", por tanto, sangre y una fracción o componente de la sangre incluyendo suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el método de detección de la invención puede usarse para detectar un ARN, proteína o ADN genómico analito en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ARN analito incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína analito incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western,

inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un ADN genómico analito incluyen hibridaciones de tipo Southern. Se describen procedimientos para llevar a cabo inmunoensayos, por ejemplo en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. -Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína analito incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo contra proteína analito marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

10 Polipéptidos quiméricos

Los polipéptidos quiméricos dados a conocer en el presente documento incluyen un primer y un segundo dominios unidos operativamente entre sí. El primer dominio incluye al menos una parte de un polipéptido de receptor de tipo Toll, mientras que el segundo dominio incluye al menos una parte de proteína auxiliar MD. Los dominios primero y segundo pueden aparecer en cualquier orden en el péptido, y el péptido puede incluir uno o más de cada dominio. La proteína quimérica comprende al menos una parte biológicamente activa de un polipéptido de receptor de tipo Toll o una proteína auxiliar MD. El péptido quimérico es soluble. Por soluble quiere decirse la capacidad de disolverse en un fluido.

20 Un "polipéptido de receptor de tipo Toll" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a al menos una parte de un polipéptido de receptor de tipo Toll. Un polipéptido de receptor de tipo Toll incluye, por ejemplo, TLR 1-10 y RP105. El polipéptido de receptor de tipo Toll, y/o ácido nucleicos que codifican para el polipéptido de receptor de tipo Toll, pueden construirse usando las secuencias codificantes de polipéptido de receptor de tipo Toll que se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo los n.^{os} de registro de GenBank. (CAH72620; CAH72619; NP_003254; NP_003255; NP_003259; NP_006059; NP_057646; NP_003256; AAH33651; CAD99157; AAM23001; BAB43955; AAF05316; AAK26744; AAF78037; AAF78036; AAF78035; BAB19259; AAF64061; AAF60188; AAF89753; AAF07823; BAA78631; AAC34135; AAC34134; AAC34133; AAC34137). Dentro de la proteína quimérica, el polipéptido de receptor de tipo Toll puede corresponder a la totalidad o una parte de un polipéptido de receptor de tipo Toll. Preferiblemente, el polipéptido de receptor de tipo Toll incluye la parte extracelular del polipéptido.

Una "proteína auxiliar MD" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a al menos una parte de una proteína auxiliar MD. La proteína MID es, por ejemplo, MD-1 o MD-2. La proteína auxiliar MD, y/o los ácidos nucleicos que codifican para la proteína auxiliar MID, pueden construirse usando las secuencias codificantes de proteína auxiliar MD que se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo los n.^{os} de registro de GenBank, 095711 (MD-1); AAC98152 (MD-1); Q9Y6Y9 (MD-2); NP_056179 (MD-2); AAH20690 (MD-2); y BAA78717 (MD-2). Se muestran secuencias de ácido nucleico y proteína auxiliar MD a modo de ejemplo en las figuras 32A, 32B, 33A y 33B. Dentro de la proteína quimérica, la proteína auxiliar MD puede corresponder a la totalidad o una parte de una proteína auxiliar MD.

La proteína quimérica puede unirse a uno o más restos adicionales. Por ejemplo, la proteína quimérica puede unirse adicionalmente a una proteína de fusión de GST en la que las secuencias de proteína de fusión de glicoproteína I β se fusionan con el extremo C-terminal de la secuencia de GST (es decir, glutatión-S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína quimérica.

En otra realización, la proteína quimérica incluye una secuencia señal heteróloga (es decir, una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido codificado por un polipéptido de receptor de tipo Toll o ácido nucleico de proteína auxiliar MD) en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal de polipéptido de receptor de tipo Toll nativa puede eliminarse y sustituirse por una secuencia señal de otra proteína. En determinadas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de proteína quimérica pueden aumentarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Una proteína quimérica puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, se ligan entre sí en marco fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptido según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos terminales romos o en bisel para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables y ligamiento enzimático. En otra realización, la fusión génica puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden aparearse posteriormente y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que codifican para un resto de fusión (por

ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un ácido nucleico que codifica para glicoproteína I α puede clonarse en un vector de expresión de este tipo de manera que el resto de fusión esté unido un marco a la proteína inmunoglobulina.

5 Dentro de la proteína quimérica, el término “operativamente unido” pretende indicar que los polipéptidos primero y segundo están unidos químicamente (lo más normalmente mediante un enlace covalente tal como un enlace peptídico) de manera que permite que se asocie al menos una función con el polipéptido de receptor de tipo Toll y la proteína auxiliar MD. Cuando se usa para referirse a ácidos nucleicos que codifican para la proteína quimérica, el término operativamente unido significa que un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de receptor de tipo Toll o la proteína auxiliar MD se fusionan en marco entre sí. La proteína auxiliar MD puede fusionarse al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del polipéptido de receptor de tipo Toll. Opcionalmente, el polipéptido de receptor de tipo Toll y la proteína auxiliar MD se unen mediante un brazo espaciador. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre los restos conjugados y pueden ayudar de ese modo a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en forma de un resto de polipéptido que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo prolina, serina o glicina. Preferiblemente, el polipéptido de receptor de tipo Toll y la proteína auxiliar MD se unen mediante un ligador de glicina-serina flexible. Alternativamente, un brazo espaciador puede ser parte del reactivo de reticulación, tal como en “SPDP de cadena larga” (Pierce Chem. Co., Rockford, IL., n.º cat. 21651 H).

20 El polipéptido de receptor de tipo Toll y la proteína auxiliar MD pueden unirse mediante acoplamiento químico de cualquier manera apropiada conocida en la técnica. Muchos métodos de reticulación química conocidos no son específicos, es decir; no dirigen el punto de acoplamiento a ningún sitio particular en el polipéptido de tipo Toll o la proteína auxiliar MD. Como resultado, el uso de agentes de reticulación no específicos atacan sitios funcionales o sitios activos con bloqueo estérico, convirtiendo las proteínas conjugadas en proteínas conjugadas biológicamente inactivas.

Una forma de aumentar la especificidad de acoplamiento es acoplar químicamente de manera directa un grupo funcional que se encuentra sólo una vez o unas pocas veces en uno o ambos de los polipéptidos que van a reticularse. Por ejemplo, en muchas proteínas, la cisteína, que es el único aminoácido de proteína que contiene un grupo tiol, se produce sólo unas pocas veces. Además, por ejemplo, si un polipéptido no contiene residuos de lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el extremo amino-terminal de ese polipéptido. La utilización satisfactoria de este enfoque para aumentar la especificidad de acoplamiento requiere que el polipéptido tenga los residuos raros y reactivos de manera adecuada en zonas de la molécula que pueden alterarse sin pérdida de la actividad biológica de la molécula.

35 Los residuos de cisteína pueden sustituirse cuando aparecen en partes de una secuencia de polipéptido en las que su participación en una reacción de reticulación probablemente interferiría de otro modo con la actividad biológica. Cuando se sustituye un residuo de cisteína, normalmente se desea minimizar los cambios resultantes en el plegamiento del polipéptido. Los cambios en el plegamiento del polipéptido se minimizan cuando el sustituto es química y estéricamente similar a cisteína. Por estos motivos, se prefiere serina como un sustituto para cisteína. Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, puede introducirse un residuo de cisteína en una secuencia de aminoácidos del polipéptido para fines de reticulación. Cuando se introduce un residuo de cisteína, se prefiere la introducción en o cerca del extremo aminoterminal o el extremo carboxilo-terminal. Están disponibles métodos convencionales para tales modificaciones de secuencia de aminoácidos, ya se produzca el polipéptido de interés mediante síntesis química o expresión de ADN recombinante.

El acoplamiento de dos constituyentes puede lograrse mediante un agente de acoplamiento o conjugación. Hay varios reactivos de reticulación intermolecular que pueden utilizarse, véase por ejemplo, Means y Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, págs. 39-43. Entre estos reactivos están, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de J-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida (siendo ambos altamente específicos para grupos sulfhidrilo y forman uniones irreversibles); N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo de este tipo que tiene de 6 a 11 puentes de carbono-metileno (que son relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2, 4-dinitrobenzoceno (que forma uniones irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación útiles para este fin incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico para grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amino); diisocianato o diisotiocianato de hexametileno, o p-diisocianato de azofenilo (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

60 Los reactivos de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir, que tienen dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de reticulación homobifuncional preferido es bismaleimidohexano (“BMH”). BMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que

contienen sulfhidrilo en condiciones leves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están conectados por una cadena hidrocarbonada. Por tanto, BMH es útil para la reticulación irreversible de polipéptidos que contienen residuos de cisteína.

5 Los reactivos de reticulación también puede ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo reactivo con amina y un grupo reactivo con tiol, que reticularán dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Los ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales son 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo ("SMCC"), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida ("MBS"), y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida ("SMPB"), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos agentes de reticulación reacciona con una amina primaria, y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo de cisteína.

10 Los reactivos de reticulación con frecuencia tienen baja solubilidad en agua. Un resto hidrófilo, tal como un grupo sulfonato, puede añadirse al reactivo de reticulación para mejorar su solubilidad en agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de reticulación modificados para su solubilidad en agua.

15 Muchos reactivos de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no escindible en las condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de reticulación contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es escindible en las condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(propionato de succinimidilo) ("DSP"), y 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo ("SPDP") son agentes de reticulación escindibles bien conocidos. El uso de un reactivo de reticulación escindible permite que el resto de carga se separe del polipéptido de transporte tras el suministro en la célula diana. También puede ser útil una unión disulfuro directa.

20 Numerosos reactivos de reticulación, incluyendo los comentados anteriormente, están disponibles comercialmente. Las instrucciones detalladas para su uso están fácilmente disponibles a partir de proveedores comerciales. Una referencia general sobre la reticulación de proteínas y la preparación de conjugados es: Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING, CRC Press (1991).

25 También se dan a conocer derivados, fragmentos, homólogos, análogos y variantes de los péptidos quiméricos y ácidos nucleicos que codifican para estos péptidos. Para los ácidos nucleicos, derivados, fragmentos y análogos proporcionados en el presente documento se definen como secuencias de al menos 6 ácidos nucleicos (contiguos), y que tienen una longitud suficiente como para permitir la hibridación específica. Para los aminoácidos, derivados, fragmentos y análogos proporcionados en el presente documento se definen como secuencias de al menos 4 aminoácidos (contiguos), una longitud suficiente como para permitir el reconocimiento específico de un epítipo.

30 La longitud de los fragmentos son menores que la longitud del ácido nucleico o polipéptido de longitud completa correspondiente del cual se deriva el péptido quimérico o ácido nucleico que codifica para el mismo. Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o que no ser de longitud completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado. Los derivados o análogos de los péptidos quiméricos incluyen, por ejemplo, moléculas que incluyen regiones que son sustancialmente homólogas a los péptidos, en diversas realizaciones, mediante una identidad de al menos aproximadamente el 30%, 50%, 70%, 80% o el 95%, 98%, o incluso el 99% con respecto a una secuencia de aminoácidos de tamaño idéntico o en comparación con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza en un programa de homología por ordenador conocido en la técnica. Por ejemplo, la identidad de secuencia puede medirse usando software de análisis de secuencias (paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), con los parámetros por defecto en el mismo.

35 Cuando se dice que un polipéptido tiene una identidad en porcentaje específica con respecto a un polipéptido de referencia de una longitud definida, la identidad en porcentaje es con respecto al péptido de referencia. Por tanto, un péptido que es idéntico en el 50% con respecto a un polipéptido de referencia que tiene 100 aminoácidos de longitud puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que es completamente idéntico con un parte de 50 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. También podría ser un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud, que es idéntico en el 50% con respecto al polipéptido de referencia a lo largo de toda su longitud. Por supuesto, otros polipéptidos cumplirán los mismos criterios.

55 Composiciones farmacéuticas.

60 Los anticuerpos de la invención (también denominados en el presente documento "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Tales composiciones comprenden normalmente el anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción y similares, compatibles con la

administración farmacéutica. Se describen portadores adecuados en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, como texto de referencia habitual en el campo, que se incorpora como referencia al presente documento. Los ejemplos preferidos de tales portadores y diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para principios farmacéuticamente activos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; los agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis compuestos por vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil capacidad de administración mediante inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y glicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, métodos de preparación son secado a vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina o someterse a compresión para dar comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador fluido para su uso como enjuague bucal, en las que el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se hacen gárgaras y se expectora o se traga. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización en aerosol desde un dispensador o recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera en la que han de penetrar. Tales agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan para dar pomadas, ungüentos, geles o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, se preparan los compuestos activos con portadores que protegerán el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) como portadores farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que está tratándose; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación está dictada por y depende directamente de las características únicas de compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de individuos.

The composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Métodos de selección

También se dan a conocer métodos (también denominados en el presente documento "ensayos de selección") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidato o de prueba (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan o interfieren de otro modo con la unión de TLR4 a la proteína auxiliar MD-2, o compuestos o agentes candidato o de prueba que modulan o interfieren de otro modo con la función de señalización de TLR4 y/o el complejo TLR4/MD-2. También se dan a conocer métodos para identificar compuestos útiles para tratar trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante. También se dan a conocer compuestos identificados en los ensayos de selección descritos en el presente documento.

En un aspecto, se dan a conocer ensayos para seleccionar compuestos candidato o de prueba que modulan la función de señalización del complejo TLR4/MD-2 y/o la interacción entre TLR4 y MD-2. Los compuestos de prueba pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos con bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o fase de disolución paralelas direccionables espacialmente; métodos con bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método con biblioteca de "un compuesto por perla"; (*one-bead one-compound*) y métodos con bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de bibliotecas biológicas se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas. (Véase, por ejemplo, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Una "molécula pequeña" tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Se conocen en la técnica bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos o de algas, y pueden seleccionarse con cualquiera de los ensayos dados a conocer en el presente documento.

Pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt, *et al.*, 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, *et al.*, 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, *et al.*, 1993. Science 261: 1303; Carrell, *et al.*, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrell, *et al.*, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; y Gallop, *et al.*, 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

La bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (véase por ejemplo, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), o en perlas (véase Lam, 1991. Nature 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacterias (véase la patente estadounidense n.º 5.223.409), esporas (véase la patente estadounidense 5.233.409), plásmidos (véase Cull, *et al.*, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) o en fago (véase Scott y Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, *et al.* 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; y la patente estadounidense n.º 5.233.409.).

Puede introducirse un compuesto candidato en un complejo antígeno-anticuerpo y determinar si el compuesto candidato altera el complejo antígeno-anticuerpo, en el que una alteración de este complejo indica que el compuesto candidato modula la función de señalización del complejo TLR4/MD-2 y/o la interacción entre TLR4 y MD-2. Por ejemplo, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal 18H10, y el antígeno es el complejo TLR4/MD-2. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal es 16G7, 5Cl, 15Cl, 7E3 o 7E3 y el antígeno es el complejo TLR4/MD-2 o TLR4.

Alternativamente, se proporciona un complejo TLR4/MD-2 y se expone a al menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, y se introducen uno o más compuestos candidato en el complejo. Si se altera el complejo antígeno-anticuerpo tras la introducción del uno o más compuestos candidato, el compuesto candidato es útil para tratar trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante.

En una alternativa adicional, se proporciona una proteína quimérica soluble tal como se describe en el presente documento y se expone a al menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, y se introducen uno o más compuestos candidato en el complejo. Si se altera el complejo antígeno-anticuerpo tras la introducción del uno o más compuestos candidato, el compuesto candidato es útil para tratar trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante.

Puede lograrse determinar la capacidad del compuesto de prueba para interferir con o alterar el complejo antígeno-anticuerpo, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto de prueba con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que la unión del compuesto de prueba al antígeno o parte biológicamente activa del mismo pueda determinarse detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de prueba pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , o bien directa o bien indirectamente, y el radioisótopo detectarse mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento por centelleo. Alternativamente, los compuestos de prueba pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático detectarse mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en el producto.

El ensayo puede comprender poner en contacto un complejo antígeno-anticuerpo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el antígeno o alterar de otro modo el complejo antígeno-anticuerpo existente. En este ensayo, determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el antígeno y/o alterar el complejo antígeno-anticuerpo comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse preferentemente al antígeno o una parte biológicamente activa del mismo, en comparación con el anticuerpo.

Alternativamente, el ensayo comprende poner en contacto un complejo antígeno-anticuerpo con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo antígeno-anticuerpo. Determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo antígeno-anticuerpo puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad del antígeno para unirse a o interactuar con el anticuerpo, en presencia del compuesto de prueba.

Los expertos en la técnica reconocerán que, en cualquiera de los métodos de selección dados a conocer en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante, tal como anticuerpo monoclonal 18H10, 16G7, 15Cl y/o 7E3, cada uno de los cuales modula o interfiere de otro modo con la producción de citocinas proinflamatorias inducida por LPS.

Los métodos de selección dados a conocer en el presente documento pueden realizarse como un ensayo basado en células o como un ensayo libre de células. Los ensayos libres de células de la invención son adecuados para el uso de o bien la forma soluble o bien la forma unida a membrana del TLR4 y/o TLR4 cuando está complejado con MD-2, y fragmentos del mismo. En el caso de ensayos libres de células que comprenden las formas unidas a membrana de

TLR4 y/o el complejo TLR4/MD-2, puede desearse utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana de las proteínas se mantengan en disolución. Los ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Thesit[®], isotridecilo(éter de etilenglicol)_n, 1-propano-sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio, 1-propano-sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminiol (CHAPS) o 2-hidroxi-1-propano-sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminiol (CHAPSO).

En algunos ensayos, puede desearse inmovilizar o bien el anticuerpo o bien el antígeno para facilitar la separación de las formas complejadas de las no complejadas de uno o ambos tras la introducción del compuesto candidato, así como adaptar la automatización del ensayo. La observación del complejo antígeno-anticuerpo en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes pueden incluir placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de GST-anticuerpo o proteínas de fusión GST-antígeno pueden adsorberse sobre perlas de glutatión-Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan entonces con el compuesto de prueba, y se incuba la mezcla en condiciones propicias para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Tras la incubación, se lavan las perlas o los pocillos de placa de microtitulación para eliminar cualquier componente no unido, se inmoviliza la matriz en el caso de las perlas, se determina el complejo o bien directa o bien indirectamente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse desde la matriz y el nivel de formación de complejo antígeno-anticuerpo puede determinarse usando técnicas convencionales.

También pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices en los ensayos de selección de la invención. Por ejemplo, o bien el anticuerpo (por ejemplo 18H10, 16G7, 15C1 y/o 7E3) o bien el antígeno (por ejemplo, el complejo TLR4/MD-2 y/o una proteína TLR4) pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Pueden prepararse moléculas de anticuerpo o antígeno biotiniladas a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas dentro de la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o el antígeno de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo antígeno-anticuerpo de interés, pueden derivatizarse en los pocillos de la placa, y el anticuerpo o antígeno no unido atraparse en los pocillos mediante conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando otros anticuerpos de ese tipo reactivos con el anticuerpo o el antígeno.

Ensayos de diagnóstico

Los anticuerpos de la presente invención pueden detectarse mediante ensayos apropiados, por ejemplo, tipos convencionales de inmunoensayos. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de tipo sándwich en el que el complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 o fragmento de la misma se fija a una fase sólida. Se mantiene la incubación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al polipéptido inmovilizado sobre la fase sólida. Tras esta primera incubación, se separa la fase sólida de la muestra. Se lava la fase sólida para eliminar materiales no unidos y sustancias interferentes tales como proteínas no específicas que también pueden estar presentes en la muestra. Posteriormente, se incuba la fase sólida que contiene el anticuerpo de interés (por ejemplo, anticuerpo monoclonal 18H10, 16G7, 15C1 y/o 7E3) unido al polipéptido inmovilizado, con un segundo anticuerpo marcado o anticuerpo unido a un agente de acoplamiento tal como biotina o avidina. Este segundo anticuerpo puede ser otro anticuerpo anti-complejo TLR4/MD-2, otro anticuerpo anti-TLR4 u otro anticuerpo. Los marcadores para los anticuerpos se conocen bien en la técnica e incluyen radionúclidos, enzimas (por ejemplo maleato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, catalasa), fluores (isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficocianina, fluorescarmina), biotina y similares. Los anticuerpos marcados se incuban con el sólido y se mide el marcador unido a la fase sólida. Estos y otros inmunoensayos los pueden realizar fácilmente los expertos habituales en la técnica.

Un método para detectar la presencia o ausencia del complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal marcado según la invención de manera que se detecte la presencia del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en la muestra biológica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “marcado”, con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende englobar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente y el marcaje de extremos de

una sonda de ADN con biotina de manera que pueda detectarse con estreptavidina marcada de manera fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede usarse para detectar el complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Además, las técnicas *in vivo* para la detección del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-complejo TLR4/MD-2 o anti-TLR4 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

En una realización, la muestra biológica contiene moléculas proteicas del sujeto de prueba. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada mediante medios convencionales de un sujeto.

La invención también engloba kits para detectar la presencia del complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender: un compuesto marcado o un agente que puede detectar el complejo TLR4/MD-2 o TLR4, cuando no está complejo con MD-2, (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-complejo TLR4/MD-2 o un anticuerpo monoclonal anti-TLR4) en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en la muestra; y medios para comparar la cantidad de complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede empaquetarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar el complejo TLR4/MD-2 o TLR4 en una muestra.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos para la generación de anticuerpo monoclonal 18H10

A. Generación de transfectantes de TLR4/MD-2 estables

Se generaron transfectantes de TLR4/MD-2 estables en células CHO-K1 y HEK 293. Para las células CHO-K1, se clonó ADNc de TLR4 humano que codifica para una etiqueta de epítipo c-myc N-terminal, en pCDNA3.1(-)hygro (Invitrogen), y se clonó ADNc de MD-2 humana que codifica para etiquetas de epítipo de proteína C y c-myc C-terminales, en pCDNA3 (Invitrogen). Se cotransfectaron ambos constructos en células CHO usando reactivo Fugene 6™ (Roche), según las directrices del fabricante. Se seleccionaron células resistentes a antibióticos en medio de cultivo que contenía G418 500 µg/ml e higromicina B 250 µg/ml (ambos de Invitrogen).

Para seleccionar células que expresan el complejo TLR4/MD-2, se incubaron 1×10^7 células/ml en PBS 1x complementado con BSA al 1% y anticuerpo monoclonal anti-proteína C 10 µg/ml (Roche). Se lavaron una vez las células y luego se incubaron en el mismo tampón con anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con PE (dilución 1:200; Anwara). Posteriormente, se incubaron las células con microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec) y se hicieron pasar a través de una columna para MACS-CL de Midi. Se eluyeron las células retenidas en la columna y se volvieron a poner en cultivo con selección para antibióticos. Se continuaron las tandas de separación hasta que se obtuvo una población positiva uniformemente de células que expresaban el complejo TLR4/MD-2.

B. Generación de MD-2 recombinante y proteína TLR4/MD-2 quimérica

Para generar MD-2 recombinante soluble, se clonó ADNc que codifica para la proteína con etiquetas 6 X HIS y FLAG C-terminales para fines de detección y purificación, en pFASTBAC1 y se insertó posteriormente en ADN de bácmido mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron las células Sf9. 48 horas más tarde, se purificó la proteína recombinante a partir de los sobrenadantes de células infectadas usando una matriz de afinidad de NiNTA (Qiagen).

Para generar la proteína quimérica TLR4/MD-2 recombinante, se ensambló ADNc que codifica para la parte extracelular de TLR4 humano unido a MD-2 mediante un ligador de glicina-serina (GGGGS₃) usando PCR. Se incluyeron etiquetas FLAG y 6xHIS en el extremo C-terminal de MD-2 para fines de detección y purificación. Se clonó el casete de ADNc en el vector de expresión de baculovirus pFASTBAC1 (Invitrogen) y posteriormente se insertó en ADN de bácmido mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron células Sf9. 48 horas más tarde, se purificó la proteína de fusión recombinante a partir de los lisados celulares usando una matriz de afinidad de AcM anti-FLAG™ M2 (Sigma).

C. Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad (IFFA CREDO) con una inyección subcutánea (s.c.) de 10^6 células CHO/ml en adyuvante RIBI (Sigma) en los días 0, 7 y 28 tal como se describió previamente en Buell *et al.*, Blood 92: 3521-3528 (1998),

5

D. Titulaciones de suero específicas

Se extrajo sangre de los ratones en los días 0 y 14. Se evaluaron los títulos de anticuerpos específicos frente a TLR4/MD-2 en los sueros mediante análisis FACS en células 293 transfectadas con TLR4/MD-2. Se incubaron las células con sueros de ratones a diluciones de 1:250, 1:2500 y 1:25000, se lavaron, se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con APC (Molecular Probes) y se analizaron en un aparato FACScalibur (Becton Dickinson) en el canal FL-4.

10

E. Fusiones célula B/mieloma

15

Se sometieron a “hiperinmunización de refuerzo” ratones que tenían anticuerpos séricos frente a TLR4/MD-2 específicos por vía subcutánea (s.c.) con la proteína de fusión TLR4/MD-2 quimérica o bien 3 o bien 4 días antes de la fusión. Se obtuvieron los ganglios linfáticos de drenaje como fuente de células B para la fusión con la línea celular de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653. Se realizaron la extracción de las células B y las fusiones celulares tal como se describió previamente en Buell *et al.*, Blood 92: 3521-3528 (1998). Se sembraron en placas las células a una concentración aproximada de 10^4 células de mieloma/pocillo y se hicieron crecer durante 10-14 días en medio de cultivo complementado con HAT (Sigma).

20

F. Selección de hibridomas

25

Se seleccionaron los sobrenadantes de los pocillos que contenían células de hibridoma viables en células transfectadas de manera simulada frente a células de mieloma transfectadas con TLR4/MD-2 para determinar la especificidad por TLR4/MD-2 mediante análisis FACS. Entonces, se incubaron las células con el sobrenadante y anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón (Molecular Probes). Se analizaron las células en un aparato FACScalibur en el canal FL-4.

30

G. Especificidad de anticuerpos monoclonales mediante FACS

Se sembraron células HEK 293 en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía FBS al 10%. 16 horas tras la siembra en placas, se transfectaron las células con 0,75 μ g de el/los vector(es) apropiado(s) usando reactivo Fugene™ (Roche) según las directrices del fabricante. 48 horas tras la transfección, se tiñeron las células con el anticuerpo monoclonal apropiado (tal como se indica en la figura 4) y un anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a APC (Molecular Probes) y se analizaron usando el aparato FACScalibur en el canal FL-4.

35

40

H Especificidad de anticuerpos monoclonales mediante ELISA directo

Se recubrió MD-2 soluble recombinante con etiquetas de epítipo de histidina y FLAG C-terminales a una concentración de 5 μ g/ml en 50 μ l de PBS en placas de ELISA (Nunc Maxisorp). Se bloquearon los pocillos con 200 μ l de BSA al 2% en PBS y se incubaron posteriormente con el AcM apropiado a la concentración indicada en BSA al 1% en PBS. Tras 3 etapas de lavado con Tween 20 al 0,05% en PBS, se añadieron a los pocillos 50 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con HRP a una dilución de 1:5000. Tras una etapa de lavado adicional, se reveló la unión usando sustrato de TMB. Se leyeron las placas a una longitud de onda de 650 nm.

45

I. Especificidad de anticuerpos monoclonales mediante ELISA de tipo sándwich

50

Para la preparación de muestras, se transfectaron células HEK 293 con los constructos plasmídicos apropiados usando el reactivo de transfección Fugene 6™ tal como se describió en el párrafo G anterior. 48 horas tras la transfección, se recogieron las células y se aclararon mediante centrifugación. Posteriormente se incubaron las células con 18H10 biotinilado (10 μ g/ml) y se lisaron en Tris pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, NP40 al 1% que contenía inhibidores de proteasas COWLETE™ (Roche).

55

Para realizar el ELISA de tipo sándwich, se recubrieron pocillos de placas Nunc maxisorp con 50 μ l del AcM anti-FLAG™ M2 (Sigma) a una concentración de 5 μ g/ml en PBS. Se bloquearon los pocillos con 200 μ l de BSA al 2% en PBS y posteriormente se incubaron con 50 μ l de las muestras apropiadas a la dilución indicada. Se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de Tween 20 al 0,05% en PBS y se incubaron con 50 μ l del anticuerpo apropiado (10 μ g/ml para 18H10 y 12D4 biotinilados, 1 μ g/ml para el AcM anti-MD-2 policlonal). Tras una etapa de lavado tal como anteriormente, se incubaron los pocillos con 50 μ l del anticuerpo de detección apropiado (estreptavidina

60

conjugada con HRP a una dilución de 1:1500 para los AcM biotinilados y anticuerpo anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con HRP a una dilución de 1:5000 para el Ac de conejo policlonal). Tras una etapa de lavado adicional, se reveló la unión usando sustrato de TMB. Se leyeron las placas a una longitud de onda de 650 nm.

5 J. Ensayo celular 1

Se purificó en primer lugar el anticuerpo monoclonal de sobrenadante de células de hibridoma usando cromatografía de afinidad con proteína G.

10 Se sembraron en placas células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 en medio de cultivo que contenía FBS al 10% a 5×10^5 células/ml en 9 placas de 6 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por 100 μ l de medio de cultivo que contenía FBS al 2% y el anticuerpo monoclonal apropiado al doble de la concentración final deseada durante 30 minutos a 37°C. Entonces, se añadió LPS (K12LD25, Sigma) a las células a una concentración de 30 ng/ml en 100 μ l de medio de cultivo que contenía FBS al 2%. Se incubaron las células a 37°C durante 16 horas y se recogieron los sobrenadantes. Se midió el contenido en IL-8 mediante ELISA de tipo sándwich usando el par de anticuerpos monoclonales 801E y M802B (Endogen).

15 K. Ensayo celular 2

20 Se diluyó sangre completa humana 1:4 con RPMI (Sigma) y se sembró en placas a 100 μ l/pocillo en placas de 96 pocillos con el anticuerpo monoclonal apropiado al doble de la concentración final deseada durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió LPS (K12LD25, Sigma), dosificado al doble de la concentración final deseada en 100 μ l de RPMI que contenía HSA 5 mg/ml y se incubó durante 6 horas a 37°C. Entonces, se centrifugaron las placas a 2000 rpm durante 5 minutos y se conservó el sobrenadante de cada pocillo. Se determinaron las concentraciones de IL-8 mediante ELISA de tipo sándwich usando el par de anticuerpos monoclonales 801E y M802B (Endogen), tal como se describió anteriormente.

L. Secuencias de VH y VL de 18H10

30 Se recogieron 10^7 células de hibridoma y se lavaron una vez con PBS antes de resuspenderse en 1 ml de reactivo Trizol™ (Invitrogen). Posteriormente, se extrajo el ARN total según las directrices del fabricante. Se generó ADNc que codifica para la VH y VL de tres subclones independientes del hibridoma 18H10 mediante RT-PCR con el módulo ScFv de ratón (Amersham Biosciences) según las directrices del fabricante. Se clonaron los productos amplificados en el vector pGEM-T easy (Promega Corp.) y se secuenciaron usando los cebadores T7 y SP6.

35 Posteriormente, se clonaron los ADNc de VH y VL en vectores de expresión de mamífero que contenían las regiones constantes kappa humana y de IgG1 humana, respectivamente, con el fin de expresar 7E3 como un AcM quimérico ("7E3 quimérico"). Para producir el AcM quimérico recombinante, se sembraron en placas células HEK 293 en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía FBS al 10%. 16 horas tras la siembra en placas, se transfectaron las células con 0,75 μ g del/de los vector(es) apropiado(s) usando reactivo Fugene™ (Roche) según las directrices del fabricante. 48 horas tras la transfección, se recogió el sobrenadante y se purificó el anticuerpo usando cromatografía de afinidad con proteína G.

45 Ejemplo 2: Generación de AcM 18H10 dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 humano

Se monitorizaron ratones inmunizados con células CHO que expresaban TLR4/MD-2 de superficie para determinar los títulos séricos específicos. Se sometieron a "hiperinmunización de refuerzo" aquéllos que mostraron una respuesta frente a TLR4/MD-2, con la proteína quimérica TLR4/MD-2 recombinante. Se eligió esta estrategia con el fin de garantizar que se expusiera inicialmente el sistema inmunitario a un complejo TLR4/MD-2 conformacional mientras que se minimizaba la respuesta a antígenos de células CHO no específicos y se maximizaba simultáneamente la respuesta específica a TLR4/MD-2 tras la hiperinmunización de refuerzo. Se realizó la selección mediante FACS de los sobrenadantes de los hibridomas que resultaron de fusiones de células B/mieloma en células CHO transfectadas de manera simulada frente a transfectadas con TLR4/MD-2. El anticuerpo monoclonal de un clon particular, denominado en el presente documento 18H10, demostró unión específica a células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 (figura 1). Se encontró que este anticuerpo tenía el isotipo IgG2b κ , tal como se determinó mediante FACS usando el kit de isotipado de Ig de ratón CBA (Beckton Dickinson).

Ejemplo 3: Neutralización por AcM 18H10 de la actividad de LPS en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2

60 Se sabe que LPS tiene la capacidad de inducir la producción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con el complejo TLR4/MD-2. Se analizó la capacidad de 18H10 para inhibir esta inducción de IL-8 preincubando células con el anticuerpo durante 30 minutos antes de la administración de LPS. La figura 2 muestra que 18H10 inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293, incluso a concentraciones inferiores a 1 μ g/ml.

Ejemplo 4: Neutralización por AcM 18H10 de la actividad de LPS en sangre completa humana

5 Se sometió a prueba la capacidad de 18H10 para inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana. Se sometió a prueba la actividad neutralizante de 18H10 en la sangre de 3 donantes diferentes usando un intervalo de concentración de anticuerpo monoclonal de desde 0,5 hasta 10 µg/ml. La figura 3 demuestra que 18H10 redujo significativamente el nivel de IL-8 inducida por LPS en los 3 donantes, en comparación con un control de isotipo coincidente. Se encontró que 18H10 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α-TLR4 descrito previamente (adquirido de e-biosciences). Estos resultados indican que el epítipo neutralizante reconocido por 18H10 en células HEK 293 transfectadas también se expone en la superficie en las células en sangre completa, y que 18H10 es lo suficientemente potente como para inhibir la actividad de LPS en sangre completa, incluso a concentraciones inferiores a 1 µg/ml.

Ejemplo 5: Especificidad de 18H10

15 Con el fin de determinar la especificidad del anticuerpo 18H10 monoclonal, se exploró el hecho de que 18H10 no reconoce el ortólogo de conejo del complejo TLR4/MD-2 (clonado previamente). Se transfectaron ADNc para TLR4 o bien humano o bien de conejo con etiqueta de epítipo FLAG™ N-terminal y MD-2 o bien humana o bien de conejo con etiquetas de epítipo de proteína C y c-Myc C-terminales en células HEK 293 en las siguientes combinaciones: 20 (1) TLR4 humano y MD-2 humana; (2) TLR4 de conejo y MD-2 de conejo; (3) TLR4 humano y MD-2 de conejo; (4) TLR4 de conejo y MD-2 humana. La figura 4 muestra el análisis FACS de estas células tras la tinción de anticuerpos, lo que reveló que 18H10 reconocía células que expresaban el complejo TLR4/MD-2 humano y una combinación de TLR4 humano y MD-2 de conejo, pero no el complejo TLR4/MD-2 de conejo ni una combinación de TLR4 de conejo y MD-2 humana. Estos resultados indican que el epítipo reconocido por 18H10 se sitúa en MD-2 humana (figura 4).

Aunque 18H10 muestra especificidad para MD-2, se determinó que 18H10 sólo reconoce MD-2 en el contexto de su interacción con TLR4. Usando ELISA directo, no se detectó unión de 18H10 a MD-2 soluble recombinante generada con el sistema de expresión de baculovirus (figura 5a). Además, la figura 5b revela que 18H10 sólo se unió a un complejo de TLR4 y MD-2 tal como se muestra a partir de lisados celulares cotransfectados, y no reconoció ni MD-2 sola en sobrenadantes/lisados celulares ni TLR4 solo en lisados celulares transfectados. Estos datos indican que 18H10 es específico para el complejo TLR4/MD-2 y no reconoce ningún componente del complejo por separado.

Ejemplo 6: Secuencias de VH y VL de 18H10

35 Se amplificaron las secuencias de VH y VL del clon de hibridoma de 18H10 a partir de ARN total mediante RT-PCR. Se muestra el análisis de secuencia en las figuras 6A-6F.

40 El anticuerpo 18H10 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:2, figura 6B) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 mostrada en la figura 6A, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:7, figura 6E) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:6 mostrada en la figura 6D. Los aminoácidos que engloban las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tal como se definen en Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan en texto subrayado y en cursiva en las figuras 6B y 6E y se muestran en las figuras 6C y 6F. (Véanse Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Oficina de Impresión del Gobierno de los Estados Unidos (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 18H10 tienen las siguientes secuencias: DSYIH (SEQ ID NO:3); WTDPENVNSIYDPRFQG (SEQ ID NO:4) y GYNGVYYAMDY (SEQ ID NO:5). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 18H10 tienen las siguientes secuencias: SASSSVIYMH (SEQ ID NO:8); RTYNLAS (SEQ ID NO:9); y HQWSSFPYT (SEQ ID NO:10).

Ejemplo 7: 18H10 quimérico se une a células CHO transfectadas con hTLR4-hMD2

55 Con el fin de demostrar la especificidad de las VH y VL de 18H10 clonadas para el complejo hTLR4/MD-2, se realizó un análisis FACS en células CHO transfectadas con hTLR4/MD-2 usando el AcM 18H10 quimérico (figura 6). Se detectó unión específica del AcM a la concentración indicada usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) humana marcado con APC. Se usó como control un AcM frente a IgG1 de isotipo coincidente irrelevante.

Ejemplo 8: 18H10 quimérico inhibe la producción de IL-8 inducida por LPS en células HEK 293 transfectadas con hTLR4-hMD2

60 Con el fin de demostrar la capacidad neutralizante de las VH y VL de 18H10 clonadas para LPS, se sometió a prueba la capacidad de 18H10 para inhibir la inducción de IL-8 dependiente de LPS de células HEK 293 transfectadas con hTLR4-hMD2 (tal como se describió anteriormente). La figura 7 muestra que 18H10 quimérico

inhibió los efectos de LPS sobre células HEK 293 de una manera muy similar a la del AcM de ratón 18H10 original.

Ejemplo 9: Materiales y métodos para la generación de anticuerpo monoclonal 16G7

5 A. Generación de transfectantes de TLR4/MD-2 estables

Se generaron transfectantes de TLR4/MD-2 estables en células CHO-K1 y HEK 293. Para las células CHO-K1, se clonó ADNc de TLR4 humano que codifica para una etiqueta de epítipo c-myc N-terminal, en pCDNA3.1(-)hygro (Invitrogen), y se clonó ADNc de MD-2 humana que codifica para las etiquetas de epítipo de proteína C y c-myc C-terminales, en pCDNA3 (Invitrogen). Se cotransfectaron ambos constructos en células CHO usando reactivo Fugene 6™ (Roche), según las directrices del fabricante. Se seleccionaron células resistentes a antibióticos en medio de cultivo que contenía G418 500 µg/ml e higromicina B 250 µg/ml (ambos de Invitrogen).

15 Para las células HEK 293, se clonó ADNc de TLR4 humano que codifica para una etiqueta de epítipo-FLAG™ N-terminal, en pCDNA3.1 (-)hygro (Invitrogen), y se clonó ADNc de MD-2 humana que codifica para etiquetas de epítipo 6x-histidina y FLAG™ extremo C-terminales, en pCDNA3 (Invitrogen). Se transfectaron ambos constructos en células HEK 293, y se seleccionaron células resistentes a antibióticos en medio de cultivo que contenía G418 500 µg/ml e higromicina B 250 µg/ml (ambos de Invitrogen), tal como se describió anteriormente.

20 Para seleccionar células que expresan el complejo TLR4/MD-2, se incubaron 1×10^7 células/ml en PBS 1x complementado con BSA al 1% y, o bien anticuerpo monoclonal anti-proteína C 10 µg/ml (para células CHO; Roche) o bien anticuerpo monoclonal anti-FLAG (para células 293; Sigma). Se lavaron las células una vez y luego se incubaron en el mismo tampón con anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con PE (dilución 1:200; Anwara). Posteriormente, se incubaron las células con microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec) y se hicieron pasar a través de una columna para MACS-CL de Midi. Se eluyeron las células retenidas en la columna y se pusieron de nuevo en cultivo con selección de antibióticos. Se continuaron las tandas de separación hasta que se obtuvo una población positiva uniformemente de células que expresaban el complejo TLR4/MD-2.

30 B. Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones BALB/C hembra de 8 semanas de edad (IFFA CREDO) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección C.

35 C. Titulaciones séricas específicas

Se realizaron titulaciones de sueros de ratones tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección D.

D. Fusiones de células B/mieloma

40 Se sometieron a "hiperinmunización" de refuerzo por vía subcutánea (s.c.) ratones que tenían anticuerpos séricos frente a TLR4/MD-2 específicos, con HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2 o bien 3 o bien 4 días antes de la fusión. Se obtuvieron los ganglios linfáticos de drenaje como fuente de células B para la fusión con la línea celular de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653. Se realizaron la extracción de las células B y las fusiones celulares tal como se describió previamente en Buell *et al.*, Blood 92: 3521-3528 (1998). Se sembraron en placas las células a una concentración aproximada de 10^4 células de mieloma/pocillo y se hicieron crecer durante 10-14 días en medio de cultivo complementado con HAT (Sigma).

E. Selección de hibridomas

50 Se seleccionaron los hibridomas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección F.

F. Especificidad de anticuerpos monoclonales

55 Se determinó la especificidad del anticuerpo monoclonal 16G7 tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección G.

G. Ensayo celular 1

60 Se realizó el ensayo celular I tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección J.

H. Ensayo celular 2

Se realizó el ensayo celular II tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección K.

I. Secuencias de VH y VL de 16G7

5 Se recogieron 10^7 células de hibridoma y se lavaron una vez con PBS antes de resuspenderse en 1 ml de reactivo Trizol™ (Invitrogen). Posteriormente, se extrajo el ARN total según las directrices del fabricante. Se generó ADNc que codifica para las VH y VL del clon de 16G7 mediante RT-PCR con el módulo ScFv de ratón (Amersham Biosciences) según las directrices del fabricante. Se clonaron los productos amplificados en el vector pGEM-T easy (Promega Corp.) y se secuenciaron usando los cebadores T7 y SP6.

10 Ejemplo 10: Generación de AcM 16G7 dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 humano

15 Se monitorizaron ratones inmunizados con células CHO que expresaban TLR4/MD-2 de superficie para determinar títulos séricos específicos. Se sometieron a “hiperinmunización de refuerzo” aquéllos que mostraron una respuesta frente a TLR4/MD-2, con transfectantes de TLR4//MD-2 en HEK 293. Se eligió esta estrategia con el fin de minimizar la respuesta de antígenos de células CHO no específicos, mientras que se maximizaba simultáneamente la respuesta específica a TLR4/MD-2. Se realizó selección mediante FACS de los sobrenadantes de hibridomas que resultaron de fusiones de células B/mieloma en células CHO transfectadas de manera simulada frente a transfectadas con TLR4/MD-2. El anticuerpo monoclonal de un clon específico, denominado en el presente documento 16G7, demostró unión específica a células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 (figura 9). Se encontró que 16G7 tenía el isotipo IgG1 κ , tal como se determinó mediante FACS usando el kit de isotipado de Ig de ratón CBA (Beckton Dickinson).

Ejemplo 11: Neutralización por 16G7 de la actividad de LPS en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2

25 Se sabe que LPS tiene la capacidad de inducir la producción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con el complejo TLR4/MD-2. Se analizó la capacidad de 16G7 para inhibir la inducción de IL-8 preincubando células con cada anticuerpo durante 30 minutos antes de la administración de LPS. La figura 10 muestra que 16G7 inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293, incluso a concentraciones de submicrogramo/ml.

30 Ejemplo 12: Neutralización por 16G7 de la actividad de LPS en sangre completa humana

35 Se sometió a prueba la capacidad de 16G7 para inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana. Se sometió a prueba la actividad neutralizante de 16G7 en la sangre de 3 donantes diferentes usando un intervalo de concentraciones de anticuerpo monoclonal de desde 0,5 hasta 5 μ g/ml. La figura 11 demuestra que 16G7 redujo significativamente el nivel de IL-8 inducida por LPS en los 3 donantes, en comparación con un control de isotipo coincidente. Se encontró que 16G7 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α -TLR4 descrito previamente (de e-biosciences). (Véase Shimazu *et al.* J. Exp. Med. 189: 1777-1782 (1999)). En algunos casos, se encontró que 16G7 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α -CD14 que también se incluyó en el estudio. (Véase Kirkland *et al.* J. Biol. Chem. 268: 24818-24823 (1993)). Estos resultados indican que el epítipo neutralizante reconocido por 16G7 en las células HEK 293 transfectadas también se expone en la superficie en las células en sangre completa, y que 16G7 es lo suficientemente potente como para inhibir la actividad de LPS en sangre completa, incluso a concentraciones inferiores a 1 μ g/ml.

45 Ejemplo 13: Especificidad de 16G7

50 Con el fin de determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal 16G7, se exploró el hecho de que 16G7 no reconoce el ortólogo de conejo del complejo TLR4/MD-2 (clonado previamente). Se transfectaron ADNc para TLR4 o bien de conejo o bien humano con etiqueta de epítipo FLAG™ N-terminal y MD-2 con etiquetas de epítipo de proteína C y c-myc C-terminales en células HEK 293 en las siguientes combinaciones: (1) TLR4 de conejo y MD-2 de conejo; (2) TLR4 humano y MD-2 humana; (3) TLR4 de conejo y MD-2 humana; (4) TLR4 humano y MD-2 de conejo. La figura 12 muestra el análisis FACS de estas células tras la tinción de anticuerpos, que reveló que 16G7 reconocía células que expresaban el complejo TLR4/MD-2 humano y una combinación de TLR4 humano y MD-2 de conejo, pero no el complejo TLR4/MD-2 de conejo ni una combinación de TLR4 de conejo y MD-2 humana. Estos resultados indican que el epítipo reconocido por 16G7 se sitúa en TLR4 humano (figura 12).

55 Ejemplo 14: Secuencias de VH y VL de 16G7

60 Se amplificaron las secuencias de VH y VL del clon de hibridoma de 16G7 a partir de ARN total mediante RT-PCR. Se muestra el análisis de secuencia en las figuras 13A-13F. La alineación de las secuencias de nucleótidos de 16G7, VH y VL con secuencias de VH y VL de ratón conocidas (usando el sistema de información internacional Immunogenetics; que puede encontrarse en: <http://imgt.cines.fr>) revela que la secuencia de VH de 16G7 se asemeja más estrechamente a la subfamilia de IgHV1, mientras que VL de 16G7 pertenece a la subfamilia de IgKV1.

El anticuerpo 16G7 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:12, figura 13B) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:11 mostrada en la figura 13A, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:17, figura 13E) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:16 mostrada en la figura 13D. Los aminoácidos que engloban la CDR tal como se define por Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan en texto subrayado y en cursiva en las figuras 13B y 13E y se muestran en las figuras 13C y 13F. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 16G7 tienen las siguientes secuencias: DYWIE (SEQ ID NO:13); EILPGSGSTNYNEDFKD (SEQ ID NO:14); y EERAYYFGY (SEQ ID NO:15). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 16G7 tienen las siguientes secuencias: RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO:18); RVSNRFS (SEQ ID NO:19); y LQVTHVPPT (SEQ ID NO:20).

Ejemplo 15: Materiales y métodos para la generación del anticuerpo monoclonal 15C1

A. Generación de transfectantes de TLR4/MD-2 estables

Se generaron transfectantes de TLR4/MD-2 estables en células CHO-K1 y HEK 293 tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9, subsección A.

B. Generación de MD-2 recombinante y proteína TLR4/MD-2 quimérica

Para generar MD-2 soluble recombinante, se clonó ADNc que codifica para la proteína con etiquetas 6X HIS y FLAG C-terminales, para fines de detección y purificación, en pFASTBAC1 y posteriormente se insertó en ADN de báculo mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron células Sf9. 48 horas más tarde, se purificó la proteína recombinante de los sobrenadantes de células infectadas usando una matriz de afinidad de NiNTA (Qiagen).

Para generar la proteína quimérica TLR4/MD-2, se ensambló ADNc que codifica para la parte extracelular de TLR4 humano unido a MD-2 mediante un ligador de glicina-serina (GGGGS₃) usando PCR. Se incluyeron etiquetas FLAG y 6xHIS en el extremo C-terminal de MD-2 para fines de detección y purificación. Se clonó el casete de ADNc en el vector de expresión de baculovirus pFASTBAC1 (Invitrogen) y posteriormente se insertó en ADN de báculo mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron células Sf9. 48 horas más tarde, se purificó la proteína de fusión recombinante de los lisados celulares usando una matriz de afinidad de AcM anti-FLAG™ M2 (Sigma).

C. Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones BALB/C hembra de 8 semanas de edad (IFFA CREDO) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección C.

D. Titulaciones séricas específicas

Se realizaron titulaciones de suero de ratones tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección D.

E. Fusiones de células B/mieloma

Se realizaron la extracción de células B y la fusión celular y se analizaron tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9, subsección D.

F. Selección de hibridomas

Se realizó la selección de hibridomas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección F.

G. Especificidad de anticuerpos monoclonales

Se determinó la especificidad del anticuerpo monoclonal 15C1 tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección G.

H. Ensayo celular 1

Se realizó el ensayo celular I tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección J.

I. Ensayo celular 2

Se realizó el ensayo celular II tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección K.

J. Secuencias de VH y VL de 15C1

5 Se recogieron 10^7 células de hibridoma y se lavaron una vez con PBS antes de resuspenderse en 1 ml de reactivo Trizol™ (Invitrogen). Posteriormente, se extrajo el ARN total según las directrices del fabricante. Se generó ADNc que codifica para las VH y VL del clon de 15C1 mediante RT-PCR con el módulo ScFv de ratón (Amersham Biosciences) según las directrices del fabricante. Se clonaron los productos amplificados en el vector pGEM-T easy (Promega Corp.) y se secuenciaron usando los cebadores T7 y SP6.

10 Posteriormente, se clonaron los ADN de VH y VL en vectores de expresión de mamífero que contenían las regiones constantes kappa humana y de IgG1 humana, respectivamente con el fin de expresar 15C1 como un AcM quimérico ("15C1 quimérico"). Para producir AcM quimérico recombinante, se sembraron células HEK 293 en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía FBS al 10%. 16 horas tras la siembra en placas, se transfectaron las células con 0,75 µg del/de los vector(es) apropiado(s) usando reactivo Fugene™ (Roche) según las directrices del fabricante. 48 horas tras la transfección, se recogió el sobrenadante y se purificó el anticuerpo usando cromatografía de afinidad con proteína G.

Ejemplo 16: Generación de AcM dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 humano

20 Se monitorizaron los ratones inmunizados con células CHO que expresan TLR4/MD-2 de superficie para determinar los títulos séricos específicos. Se sometieron a "hiperinmunización de refuerzo" aquéllos que mostraron una respuesta frente a TLR4/MD-2, con transfectantes de TLR4/MD-2 en HEK 293. Se eligió esta estrategia con el fin de minimizar la respuesta frente a antígenos de células CHO no específicos, mientras que se maximizaba simultáneamente la respuesta específica a TLR4/MD-2. Se realizó la selección mediante FACS de sobrenadantes de hibridomas que resultaron de fusiones de células B/mieloma en células CHO transfectadas de manera simulada frente a transfectadas con TLR4/MD-2. El anticuerpo monoclonal de un clon específico, denominado en el presente documento 15C1, demostró unión específica a células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 (figura 14). Se encontró que 15C1 tenía el isotipo IgG1κ, tal como se determinó mediante FACS usando el kit de isotipado de Ig de ratón CBA (Beckton Dickinson).

30

Ejemplo 17: Neutralización de la actividad de LPS en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2

35 Se sabe que LPS tiene la capacidad de inducir la producción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con el complejo TLR4/MD-2. Se analizó la capacidad de 15C1 para inhibir esta inducción de IL-8 preincubando células con cada anticuerpo durante 30 minutos antes de la administración de LPS. La figura 15 muestra que 15C1 inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293, incluso a concentraciones de submicrogramo/ml.

Ejemplo 18: Neutralización de la actividad de LPS en sangre completa humana

40 Se sometió a prueba la capacidad de 15C1 para inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana. Se sometió a prueba la actividad neutralizante de 15C1 en la sangre de 3 donantes diferentes usando un intervalo de concentraciones de anticuerpo monoclonal de desde 0,5 hasta 5 µg /ml. La figura 16 demuestra que 15C1 redujo significativamente el nivel de IL-8 inducida por LPS en los 3 donantes, en comparación con un control de isotipo coincidente. Se encontró que 15C1 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α-TLR4 descrito previamente (de e-biosciences). (Véase Shimazu *et al.* J. Exp. Med. 189: 1777-1782 (1999)). En algunos casos, se encontró que 15C1 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α-CD14 que también se incluyó en el estudio. (Véase Kirkland *et al.* J. Biol. Chem. 268: 24818-24823 (1993)). Estos resultados indican que el epítipo neutralizante reconocido por 15C1 en células HEK 293 transfectadas también se expone en la superficie en las células en sangre completa, y que 15C1 es lo suficientemente potente como para inhibir la actividad de LPS en sangre completa, incluso a concentraciones inferiores a 1 µg/ml.

50

Ejemplo 19: Especificidad de 15C1

55 Con el fin de determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal 15C1, se exploró el hecho de que 15C1 no reconoce el ortólogo de conejo del complejo TLR4/MD-2 (clonado previamente). Se transfectaron ADNc de TLR4 o bien de conejo o bien humano con etiqueta de epítipo FLAG™ N-terminal y MD-2 con etiquetas de epítipo de proteína C y c-myc C-terminales en células HEK 293 en las siguientes combinaciones: (1) vector simulado (2) TLR4 humano solo (3) TLR4 humano y MD-2 humana (4) TLR4 de conejo y MD-2 de conejo; (5) TLR4 humano y MD-2 de conejo; (6) TLR4 de conejo y MD-2 humana. La figura 17 muestra el análisis FACS de estas células tras la tinción de anticuerpos, que reveló que 15C1 reconocía células que expresaban TLR4 humano solo, el complejo TLR4/MD-2 humano y una combinación de TLR4 humano y MD-2 de conejo, pero no el complejo TLR4/MD-2 de conejo ni una combinación de TLR4 de conejo y MD-2 humana. Estos resultados indican que el epítipo reconocido por 15C1 se sitúa en TLR4 humano (figura 17).

60

Ejemplo 20: Secuencias de VH y VL de 15C1

5 Se amplificaron las secuencias de VH y VL del clon de hibridoma de 15C1 a partir de ARN total mediante RT-PCR. Se muestra el análisis de secuencia en las figuras 18A-18F.

10 El anticuerpo 15C1 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:22, figura 18B) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:21 mostrada en la figura 18A, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:27, figura 18E) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:26 mostrada en la figura 18D. Los aminoácidos que engloban la CDR tal como se define en Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están resaltados en texto subrayado y en cursiva en las figuras 18B y 18E y se muestran en las figuras 18C y 18F. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 15C1 tienen las siguientes secuencias: GGYSWH (SEQ ID NO:23); YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO:24); y KDPSDGFY (SEQ ID NO:25). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 15C1 tienen las siguientes secuencias: RASQSISDHLH (SEQ ID NO:28); YASHAIS (SEQ ID NO:29); y QNGHSFPLT (SEQ ID NO:30).

Ejemplo 21: 15C1 quimérico se une a células CHO transfectadas con hTLR4-hMD2

20 Con el fin de demostrar la especificidad de las VH y VL de 15C1 clonadas para el complejo hTLR4/MD-2, se realizó un análisis FACS en células CHO transfectadas con hTLR4/MD-2 usando el AcM quimérico 15C1 (figura 19). Se detectó la unión específica de AcM a la concentración indicada usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) humana marcado con APC. Se usó como control un AcM frente a IgG1 de isotipo coincidente irrelevante.

25 Ejemplo 22: 15C1 quimérico inhibe la producción de IL-8 inducida por LPS en células HEK 293 transfectadas con hTLR4-hMD2

30 Con el fin de demostrar la capacidad neutralizante de las VH y VL de 15C1 clonadas para LPS, se sometió a prueba la capacidad de 15C1 para inhibir la inducción de IL-8 dependiente de LPS de células HEK 293 transfectadas con hTLR4/MD-2 (tal como se describió anteriormente). La figura 20 muestra que 15C1 quimérico inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293 de una manera muy similar a la del AcM 15C1.

Ejemplo 23: Materiales y métodos para la generación del anticuerpo monoclonal 7E3

35 A. Generación de transfectantes de TLR4/MD-2 estables

Se generaron transfectantes de TLR4/MD-2 estables en células CHO-K1 y HEK 293 tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9, subsección A.

40 B. Generación de MD-2 recombinante y proteína TLR4/MD-2 quimérica

Se generó MD-2 soluble recombinante tal como se describió anteriormente en el ejemplo 15, subsección B.

45 Para generar la proteína quimérica TLR4/MD-2 recombinante, se ensambló ADNc que codifica para la parte extracelular de TLR4 humano unido a MD-2 mediante un ligador de glicina-serina (GGGGS₃) usando PCR. Se incluyeron etiquetas FLAG y 6xHIS en el extremo C-terminal de MD-2 para fines de detección y purificación. Se clonó el casete de ADNc en el vector de expresión de baculovirus pFASTBAC1 (Invitrogen) y posteriormente se insertó en ADN de báculo mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron células Sf9. 48 horas más tarde, se purificó la proteína de fusión recombinante de los lisados celulares usando una matriz de afinidad de AcM anti-FLAG™ M2 (Sigma).

50 C. Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones BALB/C hembra de 8 semanas de edad (IFFA CREDO) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección C.

55 D. Titulaciones séricas específicas

Se realizaron titulaciones de suero de ratones tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección D.

60 E. Fusiones de células B/mieloma

Se realizaron la extracción de células B y la fusión celular y se analizaron tal como se describió anteriormente en el ejemplo 9, subsección D.

F. Selección de hibridomas

Se realizó la selección de hibridomas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección F.

G. Especificidad de anticuerpos monoclonales

Se determinó la especificidad del anticuerpo monoclonal 7E3 tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección G.

H. Ensayo celular 1

Se purificó en primer lugar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante de células de hibridoma usando cromatografía de afinidad con proteína G.

Se realizó el ensayo celular I tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección J.

I. Ensayo celular 2

Se realizó el ensayo celular II tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1, subsección K.

J. Secuencias de VH y VL de 7E3

Se recogieron 10^7 células de hibridoma y se lavaron una vez con PBS antes de resuspenderse en 1 ml de reactivo Trizol™ (Invitrogen). Posteriormente, se extrajo el ARN total según las directrices del fabricante. Se generó ADNc que codifica para las VH y VL del clon de 7E3 mediante RT-PCR con módulo ScFv de ratón (Amersham Biosciences) según las directrices del fabricante. Se clonaron los productos amplificados en el vector pGEM-T easy (Promega Corp.) y se secuenciaron usando los cebadores T7 y SP6.

Posteriormente, se clonaron los ADNc de VH y VL en vectores de expresión de mamífero que contenían las regiones constantes kappa humana y de IgG1 humana, respectivamente con el fin de expresar 7E3 como un AcM quimérico ("7E3 quimérico"). Para producir AcM quimérico recombinante, se sembraron células HEK 293 en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía FBS al 10%. 16 horas tras la siembra en placas, se transfectaron las células con 0,75 μg del/de los vector(es) apropiado(s) usando reactivo Fugene™ (Roche) según las directrices del fabricante. 48 horas tras la transfección, se recogió el sobrenadante y se purificó el anticuerpo usando cromatografía de afinidad con proteína G.

Ejemplo 24: Generación de AcM dirigidos contra el complejo TLR4/MD-2 humano

Se monitorizaron ratones inmunizados con células CHO que expresaban TLR4/MD-2 de superficie para determinar los títulos séricos específicos. Se sometieron a "hiperinmunización de refuerzo" aquéllos que mostraron una respuesta frente a TLR4/MD-2, con transfectantes de TLR4/MD-2 en HEK 293. Se eligió esta estrategia con el fin de minimizar la respuesta a antígenos de células CHO no específicos, mientras que se maximizaba simultáneamente la respuesta específica a TLR4/MD-2. Se realizó la selección mediante FACS de los sobrenadantes de hibridomas que resultaron de fusiones de células B/mieloma en células CHO transfectadas de manera simulada frente a transfectadas con TLR4/MD-2. El anticuerpo monoclonal de un clon específico, denominado en el presente documento 7E3, demostró unión específica a células CHO transfectadas con TLR4/MD-2 (figura 21). Se encontró que 7E3 tenía el isotipo IgG1 κ , tal como se determinó mediante FACS usando el kit de isotipado de Ig de ratón CBA (Beckton Dickinson).

Ejemplo 25: Neutralización de la actividad de LPS en células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2

Se sabe que LPS tiene la capacidad de inducir la producción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con el complejo TLR4/MD-2. Se analizó la capacidad de 7E3 para inhibir la inducción de IL-8 preincubando células con cada anticuerpo durante 30 minutos antes de la administración de LPS. La figura 22 muestra que 7E3 inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293, incluso a concentraciones de submicrogramo/ml.

Ejemplo 26: Neutralización de la actividad de LPS en sangre completa humana

Se sometió a prueba la capacidad de 7E3 para inhibir la producción de IL-8 inducida por LPS en sangre completa humana. Se sometió a prueba la actividad neutralizante de 7E3 en la sangre de 3 donantes diferentes usando un intervalo de concentraciones de anticuerpo monoclonal de desde 0,5 hasta 5 μg /ml. La figura 23 demuestra que 7E3 redujo significativamente el nivel de IL-8 inducida por LPS en los 3 donantes, en comparación con un control de

isotipo coincidente. Se encontró que 7E3 era más potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α -TLR4 descrito previamente (adquirido de e-biosciences). (Véase Shimazu *et al.* J. Exp. Med. 189: 1777-1782 (1999)). En algunos casos, se encontró que 7E3 era tan potente que un anticuerpo monoclonal que bloquea α -CD14 que también se incluyó en el estudio. (Véase Kirkland *et al.* J.Biol. Chem. 268: 24818-24823(1993)). Estos resultados indican que el epítipo neutralizante reconocido por 7E3 en células HEK 293 transfectadas también se expone en la superficie en las células en sangre completa, y que 7E3 es lo suficientemente potente como para inhibir la actividad de LPS en sangre completa, incluso a concentraciones inferiores a 1 μ g/ml.

Ejemplo 27: Especificidad de 7E3

Con el fin de determinar la especificidad del anticuerpo 7E3 monoclonal, se exploró el hecho de que 7E3 no reconoce el ortólogo de conejo del complejo TLR4/MD-2 (clonado previamente). Se transfectaron ADNc de TLR4 o bien de conejo o bien humano con etiqueta de epítipo FLAGTM N-terminal y MD-2 con etiquetas de epítipo de proteína C y c-myc C-terminales en células HEK 293 en las siguientes combinaciones: (1) vector simulado (2) TLR4 humano solo (3) TLR4 humano y MD-2 humana (4) TLR4 de conejo y MD-2 de conejo; (5) TLR4 humano y MD-2 de conejo; (6) TLR4 de conejo y MD-2 humana. La figura 24 muestra el análisis FACS de estas células tras la tinción de anticuerpos, que reveló que 7E3 reconocía células que expresaban el complejo TLR4/MD-2 humano y una combinación de TLR4 humano y MD-2 de conejo, pero no el complejo TLR4/MD-2 de conejo ni una combinación de TLR4 de conejo y MD-2 humana. Estos resultados indican que el epítipo reconocido por 7E3 se sitúa en TLR4 humano pero la presencia de MD-2 es esencial para la unión de AcM (figura 24).

Ejemplo 28: Secuencias de VH y VL de 7E3

Se amplificaron las secuencias de VH y VL del clon de hibridoma de 7E3 a partir de ARN total mediante RT-PCR. Se muestra el análisis de secuencia en las figuras 25A-25F.

El anticuerpo 7E3 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:32, figura 25B) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:31 mostrada en la figura 25A, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:37, figura 25E) codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:36 mostrada en la figura 25D. Los aminoácidos que engloban la CDR tal como se define en Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 están resaltados en texto subrayado y en cursiva en las figuras 25B y 25E y se muestran en las figuras 25C y 25F. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 7E3 tienen las siguientes secuencias: TYNIGVG (SEQ ID NO:33); HIWWNDNIYYNTVLKS (SEQ ID NO:34); y MAEGRYDAMDY (SEQ ID NO:35). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 7E3 tienen las siguientes secuencias: RASQDITNYLN (SEQ ID NO:38); YTSKLHS (SEQ ID NO:39); y QQGNTFPWT (SEQ ID NO:40).

Ejemplo 29: 7E3 quimérico se une a células CHO transfectadas con hTLR4-hMD2

Con el fin de demostrar la especificidad de las VH y VL 7E3 clonadas para el complejo hTLR4/MD-2, se realizó un análisis FACS en células CHO transfectadas con hTLR4/MD-2 usando el AcM quimérico 7E3 (figura 26). Se detectó unión específica de AcM a la concentración indicada usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) humana marcado con APC. Se usó como control un AcM frente a IgG1 de isotipo coincidente irrelevante.

Ejemplo 30: 7E3 quimérico inhibe la producción de IL-8 inducida por LPS en células HEK 293 transfectadas con hTLR4-hMD2

Con el fin de demostrar la capacidad neutralizante de las VH y VL de 7E3 clonadas para LPS, se sometió a prueba la capacidad de 7E3 para inhibir la inducción de IL-8 dependiente de LPS de células HEK 293 transfectadas con hTLR4/MD-2 tal como se describió anteriormente. La figura 27 muestra que 7E3 quimérico inhibió los efectos de LPS sobre las células HEK 293.

Ejemplo 31: Construcción de ADNc de proteína de fusión TLR4/MD-2 y clonación en pFASTBAC1.

Se ensambló la parte extracelular de TLR4 unido a MD-2 mediante un ligador de glicina-serina (GGGGS₃) usando PCR. Se incluyeron etiquetas FLAG y 6xHIS en el extremo C-terminal de MD-2 para fines de detección y purificación. (Figura 28).

Las figuras 28A-C ilustran la construcción de este ADNc de proteína de fusión TLR4/MD-2 según la presente invención. Se amplificó ADNc que codifica para la parte extracelular de TLR4 humano (sTLR4) mediante PCR, y se introdujeron sitios de restricción NheI/XhoI únicos en extensiones de cebadores no apareadas en 5'. Se introdujo la secuencia codificante de (GGGGS)₃ y el sitio XhoI único en la extensión no apareada en 5' del cebador sentido, y se introdujo un sitio HindIII único en la extensión no apareada en 5' del cebador antisentido. (Panel A). El panel B representa la clonación secuencial de los ADNc de (GGGGS)₃/MD-2 y sTLR4 amplificados, en pFASTBAC1 entre el

sitio de restricción XbaI y HindIII único. El panel C representa un producto proteico propuesto tras la expresión de los ADNc de TLR4/MD-2 en células Sf9.

Ejemplo 32: Expresión de la proteína quimérica TLR4/MD-2 en sobrenadantes y lisados de células Sf9

Se clonó el casete de ADNc del ejemplo 1 en el vector de expresión de baculovirus pFASTBAC1 (Invitrogen) y posteriormente se insertó en ADN de bácmido mediante recombinación homóloga. Tras la generación de una disolución madre viral, se superinfectaron células Sf9 y se analizó la expresión de la proteína de fusión TLR4/MD-2 en el lisado celular a las 48 y 72 horas tras la infección mediante inmunotransferencia de tipo Western. (Figura 29).

La figura 29 demuestra la expresión de una proteína quimérica TLR4/MD-2 de la invención en sobrenadantes y lisados de células Sf9. Se detectó la expresión de proteínas en los sobrenadantes y lisados de células Sf9 mediante inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-FLAG M2: el carril 1 representa lisado aclarado a las 48 horas tras la infección; el carril 2 representa lisado aclarado a las 72 horas tras la infección; el carril 3 representa sobrenadante aclarado a las 48 horas tras la infección; el carril 4 representa sobrenadante aclarado a las 72 horas tras la infección; y el carril 5 contiene una proteína de referencia (con etiqueta FLAG). Los tamaños de marcador de peso molecular en la figura 29 se muestran en KDa. El peso molecular predicho de la proteína quimérica TLR4/MD-2 es de aproximadamente 90 KDa, y la aparición de producto de degradación probable se produce a aproximadamente 28KDa.

Ejemplo 33: Purificación de la proteína quimérica TLR4/MD-2 de lisados de células Sf9 infectadas

Para purificar la proteína de fusión, se recogieron las células Sf9 48 horas tras la superinfección y se lisaron en Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 al 1% con inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche) a una concentración de 5 volúmenes/gramo de células. Tras una incubación durante quince horas (15') a 4°C, se aclararon los lisados mediante centrifugación (4000 rpm) y filtración (0,22 µm) y se hicieron pasar a través de una matriz de afinidad de AcM anti-FLAG M2 (Sigma). Se eliminó la proteína no unida de la matriz mediante lavados sucesivos con Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP40 al 1% y Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM. Se eluyó la proteína unida de la columna con glicina 100 mM (pH 2,75) y se recogió en fracciones de 0,5 ml. Se llevaron rápidamente las fracciones a pH neutro a través de la adición de 50 µl de Tris 1 M (pH 9). Se analizó el contenido en proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western (con anticuerpo anti-FLAG M2 conjugado con peroxidasa) y tinción con azul brillante de Coomassie. (Figura 30).

La figura 30 demuestra la presencia de proteína quimérica TLR4/MD-2 purificada en lisados de células Sf9 infectadas. Se detectó proteína en los lisados celulares mediante la tinción con azul brillante de Coomassie (figura 30, panel izquierdo) o inmunotransferencia de tipo Western (figura 30, panel derecho) usando el anticuerpo anti-FLAG M2. Los carriles 1-5 representan fracciones eluidas de 0,5 ml de la columna de afinidad de anti-FLAG M2.

Ejemplo 34: Inhibición de la producción de IL-8 inducida por LPS usando TLR4/MD-2 soluble quimérico

Se preincubó lipopolisacárido (LPS) (15 ng/ml) con un TLR4/MD-2 quimérico purificado según la presente invención a concentraciones variables y se incubaron posteriormente con células HEK 293 transfectadas con TLR4/MD-2. La figura 31 es un gráfico que representa la producción de IL-8 en el medio de cultivo celular 24 horas tras el tratamiento.

Tal como se observa en la figura 31, se demostró que TLR4/MD-2 quimérico soluble tenía un efecto inhibitor sobre la producción de IL-8 inducida por LPS en células HEK transfectadas con TLR4/MD-2, indicando de ese modo que la proteína TLR4/MD-2 purificada de la invención era correcta de manera conformacional al menos parcialmente.

Otras realizaciones

Aunque se ha descrito la invención junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal aislado que se une a un complejo receptor de tipo Toll 4 (TLR4)/MD-2 humano, inhibiendo el anticuerpo monoclonal al menos el 50% de la producción de IL-8 inducida por lipopolisacárido (LPS) en una disolución que comprende células HEK293 transfectadas con TLR4/MD-2 humano cuando se añade dicho anticuerpo monoclonal a dicha disolución a una concentración de 10 µg/ml, en comparación con el nivel de producción de IL-8 inducida por LPS en ausencia de dicho anticuerpo monoclonal.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, no uniéndose el anticuerpo a una proteína MD-2 humana cuando dicha proteína MD-2 no está complejada con TLR4 humano.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, uniéndose adicionalmente el anticuerpo a TLR4 humano soluble.
4. Anticuerpo según la reivindicación 1, uniéndose adicionalmente el anticuerpo a TLR4 humano en una superficie celular.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1, siendo el anticuerpo un anticuerpo humanizado.
6. Anticuerpo según la reivindicación 1, comprendiendo el anticuerpo una cadena pesada con (i) una región determinante de complementariedad 1 de VH (CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en DSYIH (SEQ ID NO: 3), DYWIE (SEQ ID NO: 13), GGYSWH (SEQ ID NO: 23) y TYNIGVG (SEQ ID NO: 33); (ii) una región determinante de complementariedad 2 de VH (CDR2) seleccionada del grupo que consiste en WTDPENVNSIYDPRFQG (SEQ ID NO: 4), EILPGSGSTNYNEDFKD (SEQ ID NO: 14), YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 24) y HIWWNDNIYYNTVLKS (SEQ ID NO: 34); y (iii) una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionada del grupo que consiste en GYNGVYYAMDY (SEQ ID NO: 5), EERAYYFGY (SEQ ID NO: 15), KDPDGFY (SEQ ID NO: 25) y MAEGRYDAMDY (SEQ ID NO: 35).
7. Anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 6, comprendiendo el anticuerpo una cadena ligera con (i) una región CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SASSSVIYMH (SEQ ID NO:8), RSSQSLENSNGNTYLN (SEQ ID NO:18), RASQISDHLH (SEQ ID NO:28) y RASQDITNYLN (SEQ ID NO:38); (ii) una región CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RTYNLAS (SEQ ID NO:9), RVSNRFS (SEQ ID NO:19), YASHAIS (SEQ ID NO:29) y YTSKLHS (SEQ ID NO:39); y (iii) una región CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en HQWSSFPYT (SEQ ID NO:10); LQVTHVPPT (SEQ ID NO:20), QNGHSFPLT (SEQ ID NO:30) y QQGNTFPWT (SEQ ID NO:40).
8. Anticuerpo según la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 12, 22 y 32 y una secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 17, 27 y 37.
9. Uso del anticuerpo según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en septicemia, lesión pulmonar inducida por ventilador, inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedades y trastornos autoinmunitarios inducidos por factores de estrés solubles endógenos en un sujeto en el que se desea tal tratamiento, en el que dicho trastorno inducido por factores de estrés solubles endógenos es osteoartritis o artritis reumatoide.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el sujeto es un ser humano.
11. Uso según la reivindicación 9, en el que se usa una cantidad de anticuerpo según la reivindicación 1 que es suficiente para reducir la producción de IL-8 inducida por LPS.
12. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha inflamación crónica está asociada con un estado alérgico o asma.
13. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha patología es un trastorno inflamatorio del intestino o aterosclerosis.
14. Uso según la reivindicación 9, en el que dicho factor de estrés soluble endógeno es Hsp60, fibronectina, heparán sulfato, hialuronano, gp96, β-Defensina-2 o proteína tensioactiva A.

15. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 y un portador.
16. Kit que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1.
- 5 17. Anticuerpo según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en septicemia, lesión pulmonar inducida por ventilador, inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedades y trastornos autoinmunitarios inducidos por factores de estrés solubles endógenos en un sujeto en el que se desea tal tratamiento, en el que dicho trastorno inducido por factor de estrés soluble endógeno es osteoartritis o artritis reumatoide.
- 10

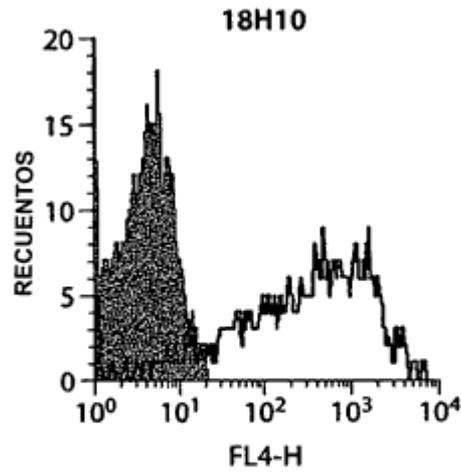


Fig. 1

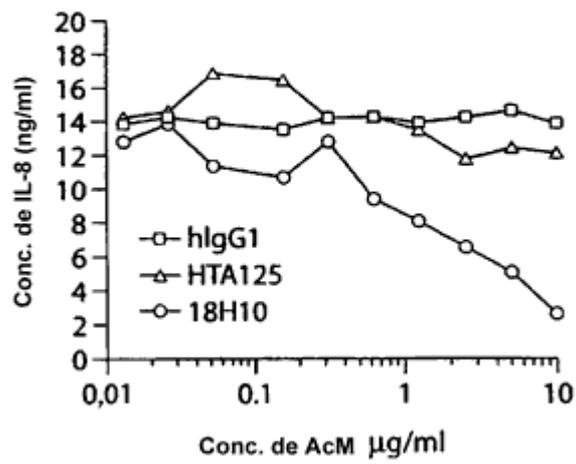


Fig. 2

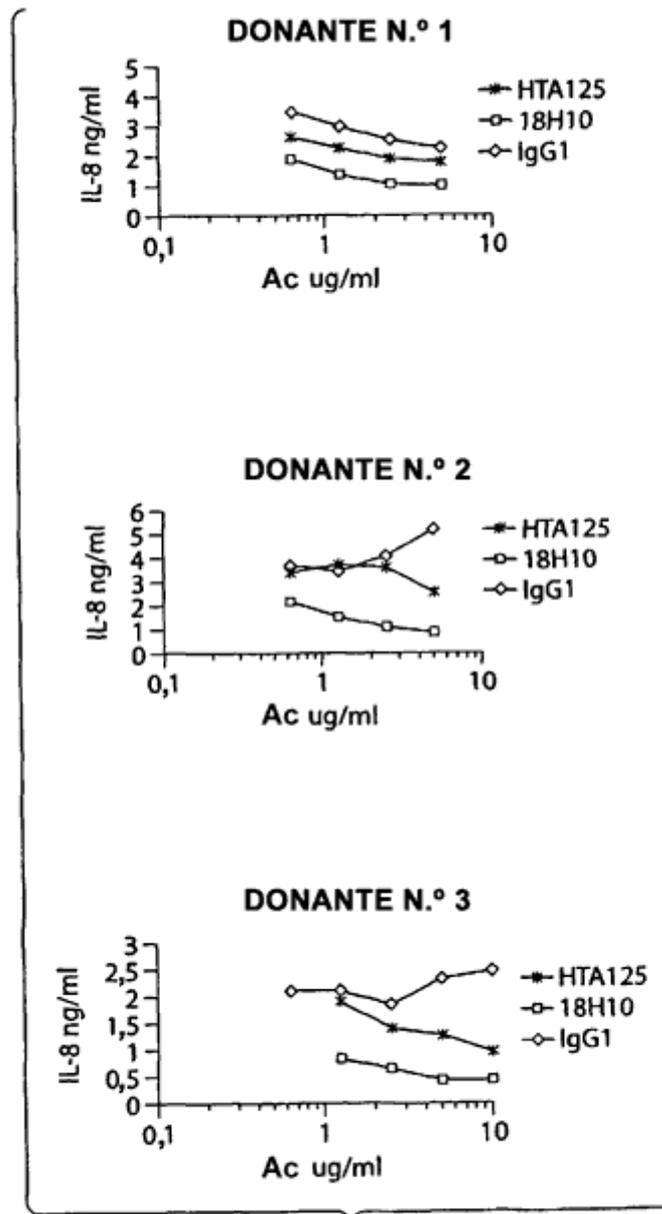


Fig. 3

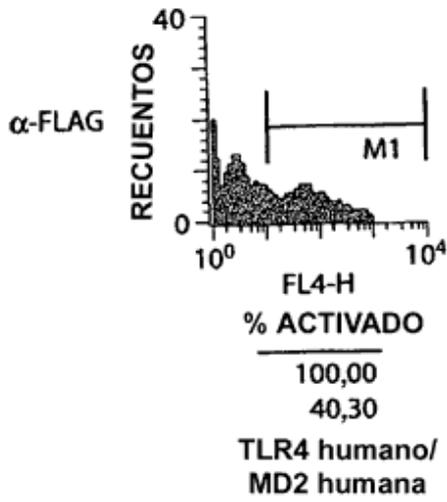


Fig. 4A

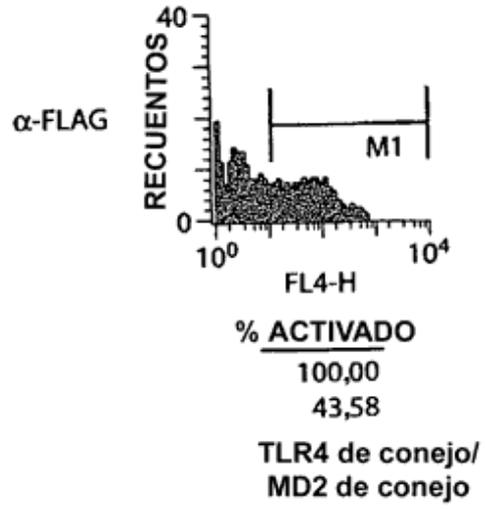


Fig. 4B

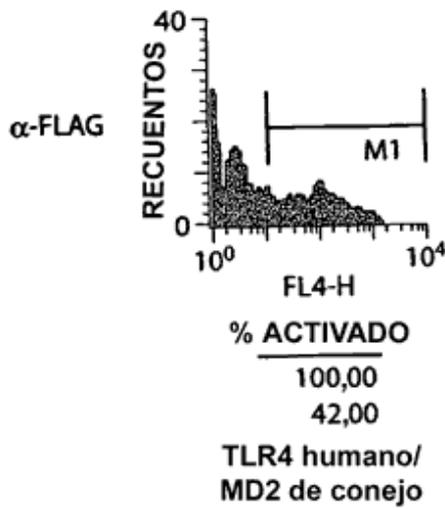


Fig. 4C

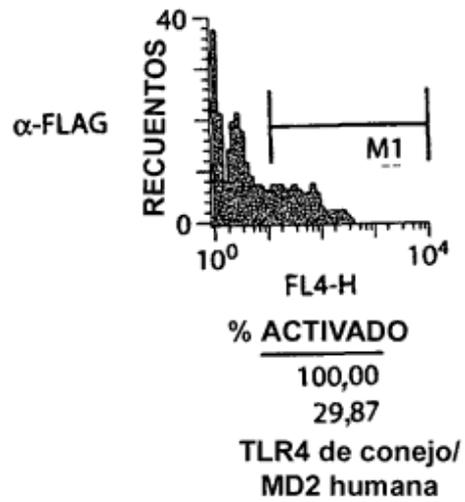
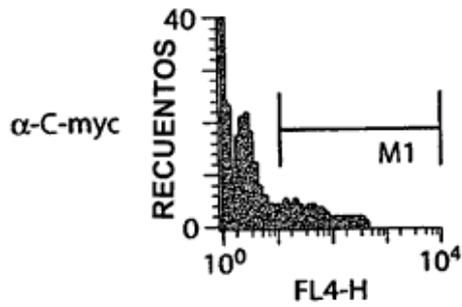


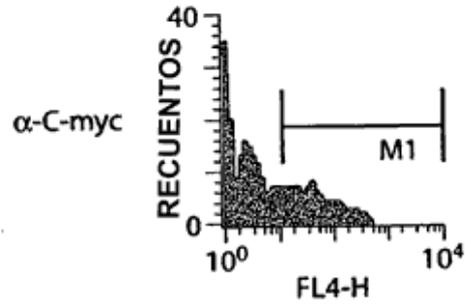
Fig. 4D



% ACTIVADO
100,00
21,15

TLR4 humano/
MD2 humana

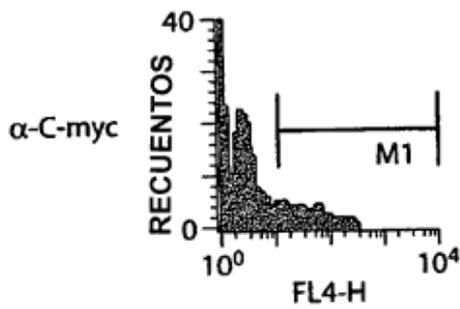
Fig. 4E



% ACTIVADO
100,00
36,32

TLR4 de conejo/
MD2 de conejo

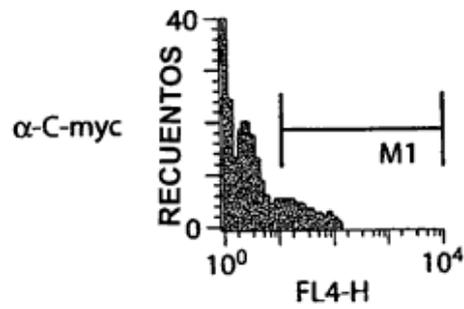
Fig. 4F



% ACTIVADO
100,00
22,12

TLR4 humano/
MD2 de conejo

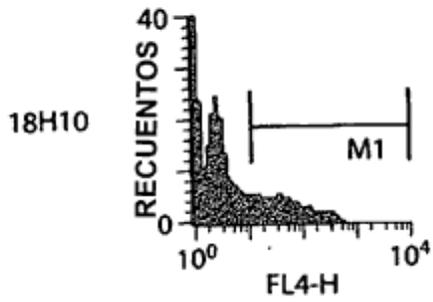
Fig. 4G



% ACTIVADO
100,00
15,81

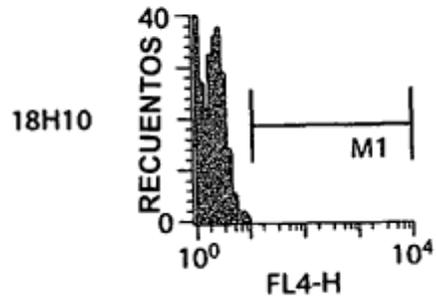
TLR4 de conejo/
MD2 humana

Fig. 4H



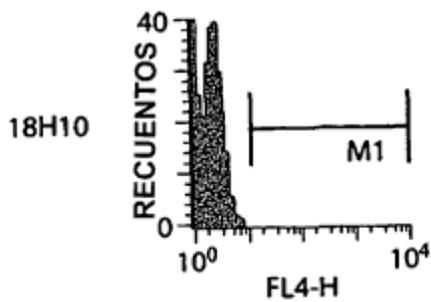
% ACTIVADO
100,00
24,03
TLR4 humano/
MD2 humana

Fig. 4I



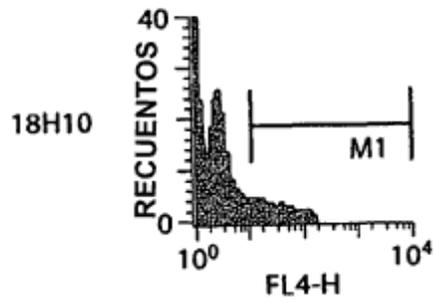
% ACTIVADO
100,00
0,04
TLR4 de conejo/
MD2 de conejo

Fig. 4J



% ACTIVADO
100,00
0,04
TLR4 humano/
MD2 de conejo

Fig. 4K



% ACTIVADO
100,00
13,75
TLR4 de conejo/
MD2 humana

Fig. 4L

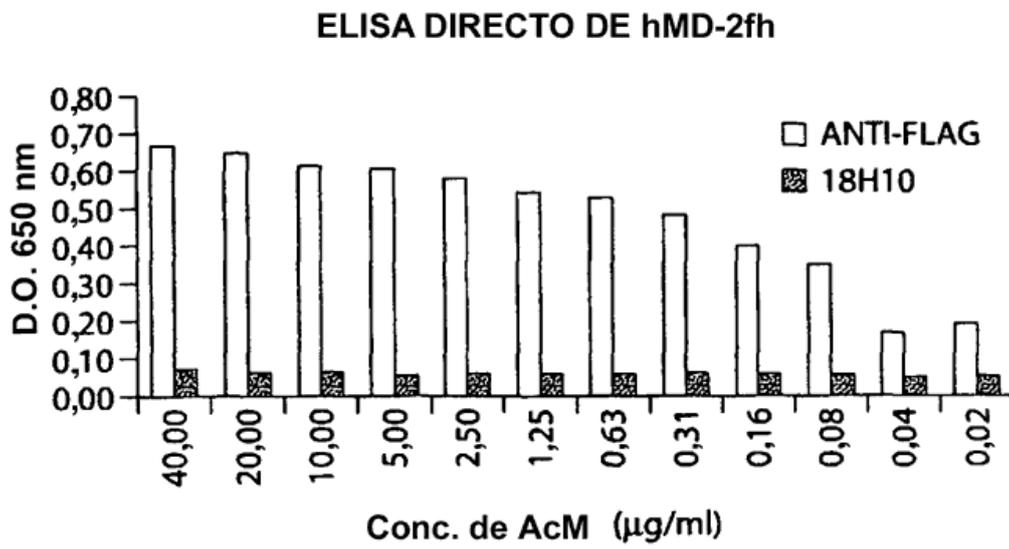


Fig. 5A

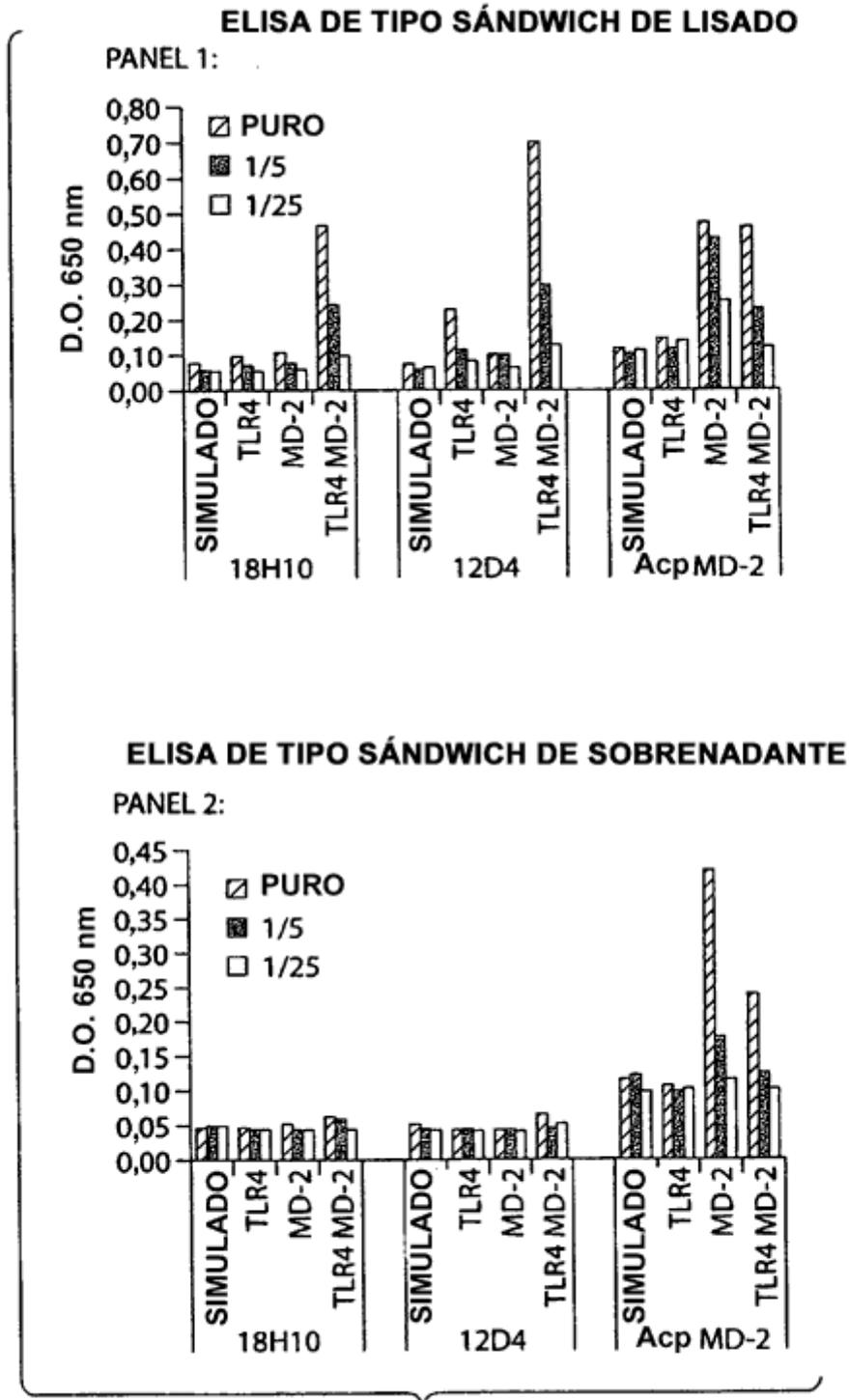


Fig. 5B

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH DE 18H10

1 caggtgcaac tgcagcagtc tggggctgat cttgtgaggc caggggcctt
 q v q l q q s g a d l v r p g a
 51 agtcaagttg tctgcacag cttctggcct caacattaaa gactcctata
 l v k l s c t a s g f n i k d s y
 101 tacactgggt gaagaagagg cctgaatggg gcctggagtg gattggatgg
 i h w v k k r p e w g l e w i g w
 151 actgatcctg agaatgttaa ttctatatat gacccgaggt ttcagggcaa
 t d p e n v n s i y d p r f q g
 201 ggccagtata acagcagaca catcctccaa cacagccttc cttcagctca
 k a s i t a d t s s n t a f l q l
 251 ccagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc taggggttat
 t s l t s e d t a v y y c a r g y
 301 aacggtgttt actatgctat ggactactgg ggccaaggga cctcagtcac
 n g v y y a m d y w g q g t s v
 351 cgtctcctca (SEQ ID NO:1)
 t v s s (SEQ ID NO:2)

Fig. 6A

SECUENCIA PROTEICA DE VH DE 18H10

1 qvqlqqsgad lvrpgalvkl sctasgfnik dsyihwvkkr pewglewigw
 51 tdpenvnsiy dprfqgkasi tadtssntaf lqltsltsed tavyycargy
 101 ngvyyamdyw gqggtvtvss (SEQ ID NO:2)

Fig. 6B

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VH DE 18H10

dsyih (SEQ ID NO:3)
 wtdpenvnsiydprfqq (SEQ ID NO:4)
 gyngvyamdy (SEQ ID NO:5)

Fig. 6C

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL DE 18H10

```

1  caaattgttc tcacccagtc tccatcaatc atgtctgcgt ctctagggga
   q i v l t q s p s i m s a s l g
51 ggagatcacc ctaacctgca gtgccagctc gagtgtaatt tacatgcact
   e e i t l t c s a s s s v i y m h
101 ggtaccagca gaagtcaggc acttctccca aactcttgat ttataggaca
   w y q q k s g t s p k l l i y r t
151 tacaacctgg cttctggagt cccttctcgc ttcagtggca gtgggtctgg
   y n l a s g v p s r f s g s g s
201 gaccttttat tctctcacia tcagcagtgt ggaggctgaa gatgctgccg
   g t f y s l t i s s v e a e d a a
251 attattactg ccatcagtgg agtagttttc cgtacacggt cggagggggg
   d y y c h q w s s f p y t f g g g
301 accaagctgg aatcaaacg g (SEQ ID NO:6)
   t k l e i k r (SEQ ID NO:7)

```

Fig. 6D

SECUENCIA PROTEICA DE VL DE 18H10

```

1  qviltqspsi msaslgeeit ltcsasssvi ymhwyqqksg tspklliyrt
51 ynlasgvpsr fsgsgsgtgy sltissveae daadyychqw ssfpytfggg
101 tkleikr (SEQ ID NO:7)

```

Fig. 6E

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VL DE 18H10

```

sasssviymh (SEQ ID NO:8)
rtynlas (SEQ ID NO:9)
hqwssfpyt (SEQ ID NO:10)

```

Fig. 6F

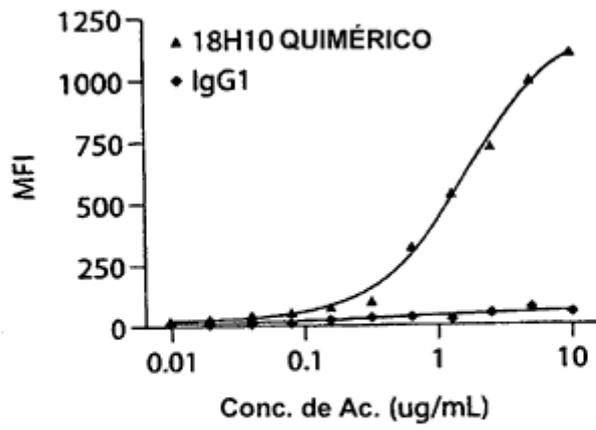


Fig. 7

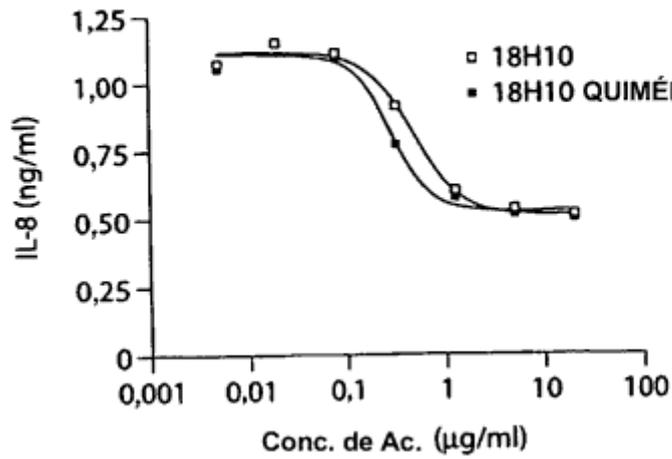


Fig. 8

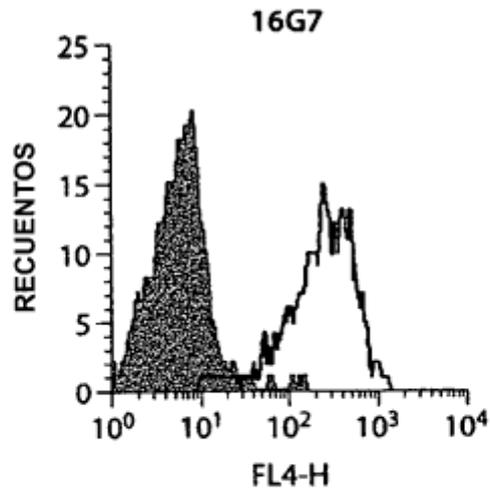


Fig. 9

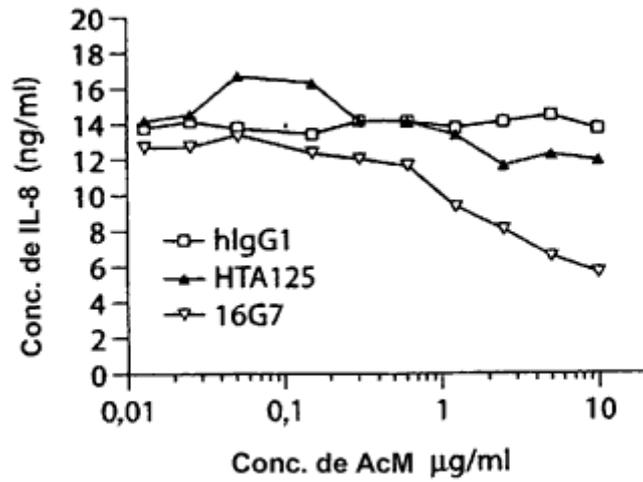


Fig. 10

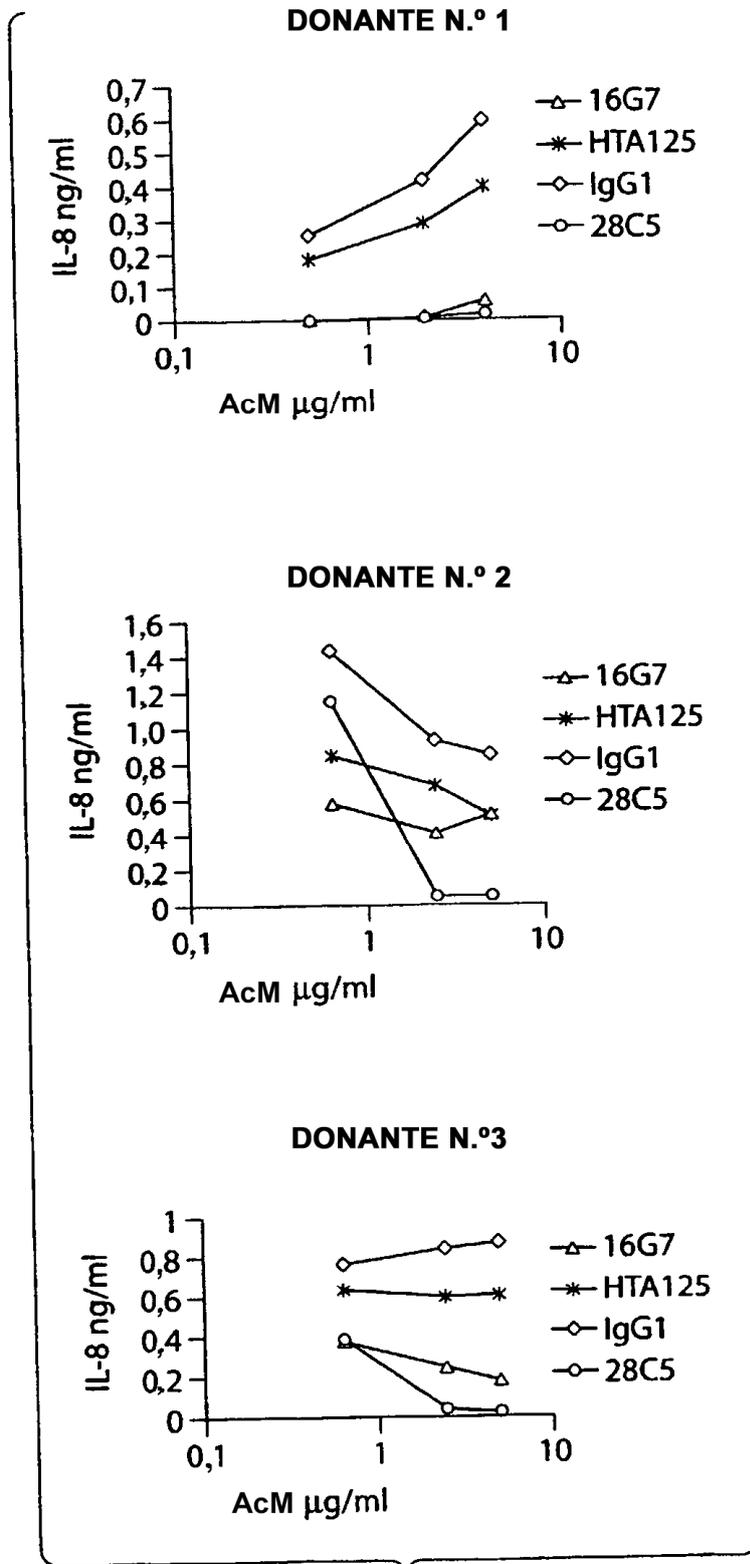
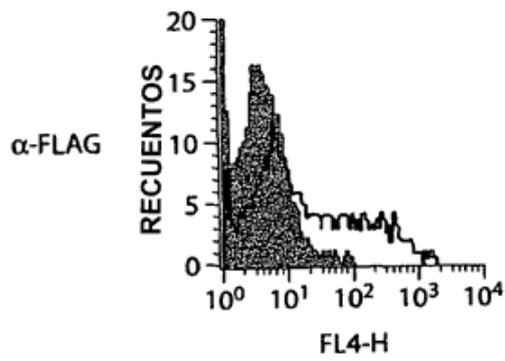
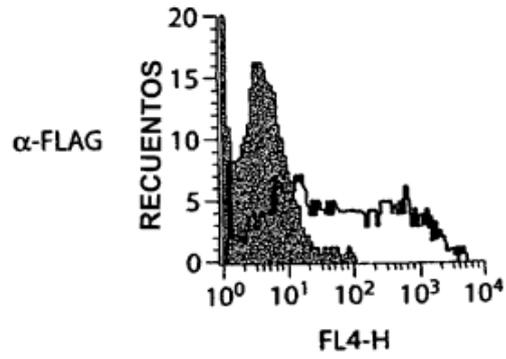


Fig. 11



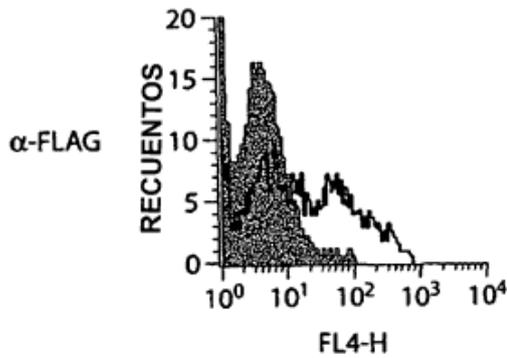
TLR4 de conejo/
MD2 de conejo

Fig. 12A



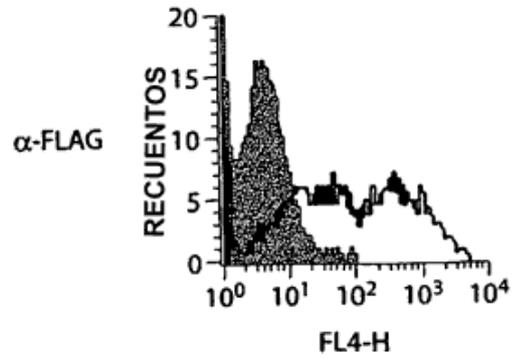
TLR4 humano/
MD2 humana

Fig. 12B



TLR4 de conejo/
MD2 humana

Fig. 12C



TLR4 humano/
MD2 de conejo

Fig. 12D

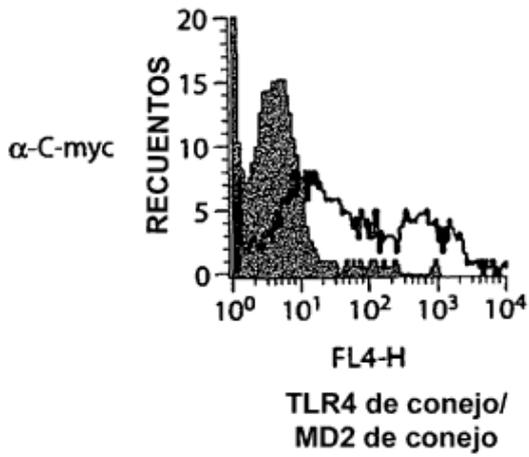


Fig. 12E

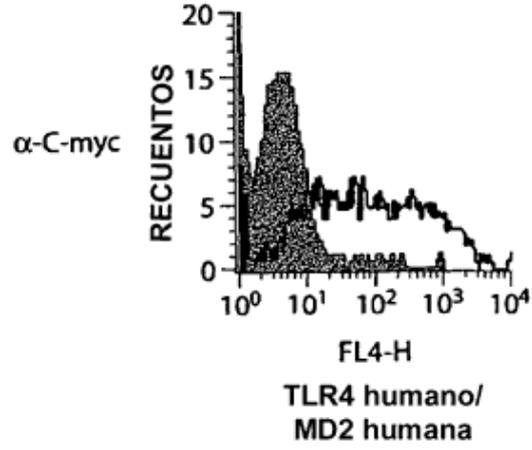


Fig. 12F

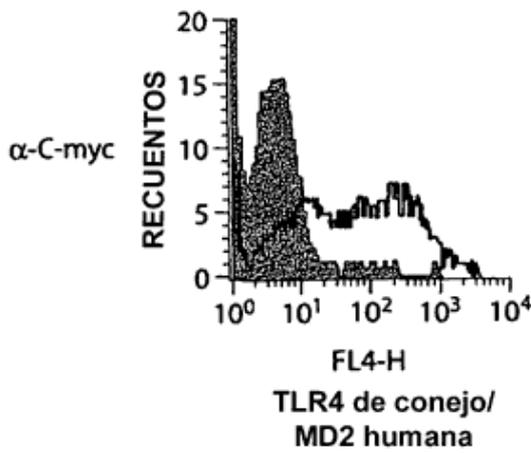


Fig. 12G

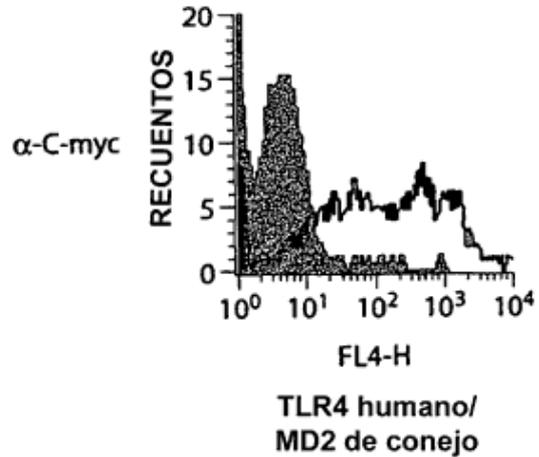


Fig. 12H

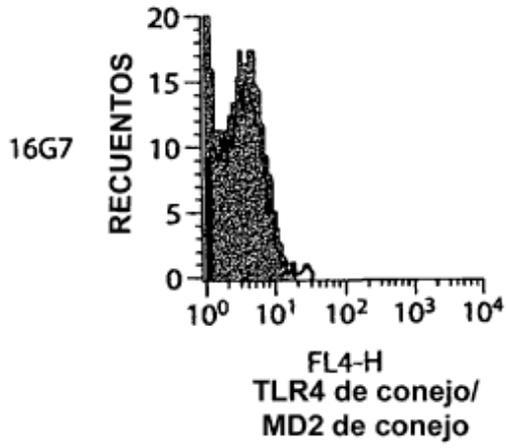


Fig. 12I

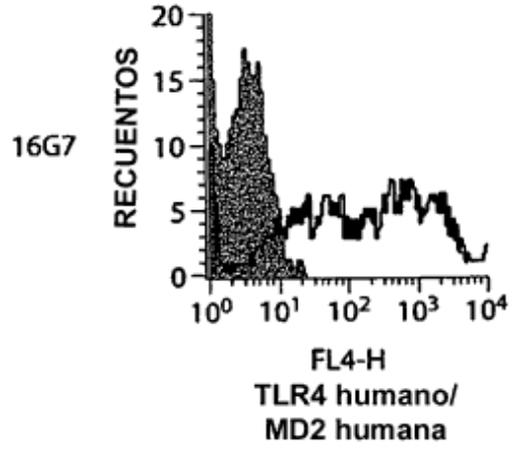


Fig. 12J

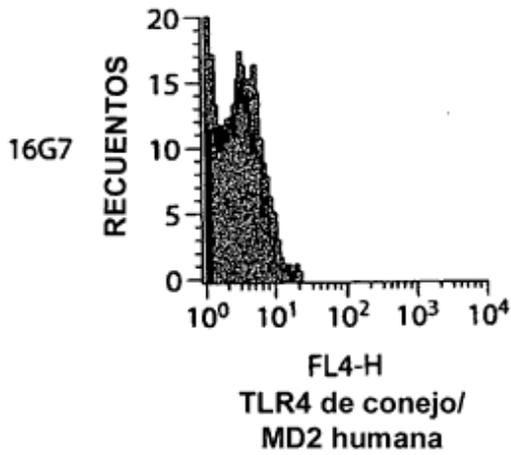


Fig. 12K

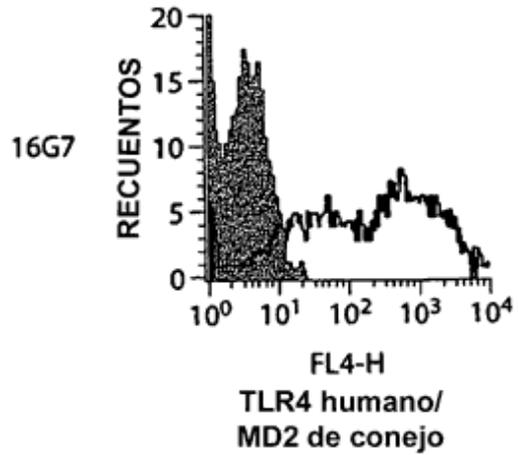


Fig. 12L

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH DE 16G7

1 aggtgaaact gcaggagtct ggagctgagc tgatgaagcc tggggcctca
v k l q e s g a e l m k p g a s
51 gtgaagatat cctgcaaggc tactggctac aaattcagtg actactggat
v k i s c k a t g y k f s d y w
101 agagtggata aaacagaggc ctggacatgg ccttgagtgg attggagaga
i e w i k q r p g h g l e w i g e
151 ttttgcctgg aagtggtagt actaactaca atgaggactt caaggacaag
i l p g s g s t n y n e d f k d k
201 gccacattca cttcagatac atcctccaac acagcctaca tgcaactcag
a t f t s d t s s n t a y m q l
251 cagcctgaca tctgaagact ctgccgtcta ttactgtgca aaagaggaga
s s l t s e d s a v y y c a k e e
301 gggcgtaacta ctttggctat tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
r a y y f g y w g q g t t v t v s
351 tca (SEQ ID NO:11)
s (SEQ ID NO:12)

Fig. 13A

SECUENCIA PROTEICA DE VH DE 16G7

1 qvqlqqsgaelmkpgasvki~~sckatgykfs~~dywiewikqrpghglewige
51 ilpgsgstnynedfkdkatftsdtsstntaymqlssltsedsavyyca~~ke~~ee
101 rayyfgywgqggtvtvss (SEQ ID NO:12)

Fig. 13B

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VH DE 16G7

dywie (SEQ ID NO:13)
eilpgsgstnynedfkd (SEQ ID NO:14)
eerayyfgy (SEQ ID NO:15)

Fig. 13C

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL DE 16G7

```

1 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
  d v l m t q t p l s l p v s l g
51 tcaagcctcc atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg
  d q a s i s c r s s q s l e n s n
101 gaaacaccta tttgaactgg tacctccaga aaccaggcca gtctccacag
  g n t y l n w y l q k p g q s p q
151 ctctgatct acaggtttc caaccgattt tctgggtcc tagacaggtt
  l l i y r v s n r f s g v l d r
201 cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg
  f s g s g s g t d f t l k i s r v
251 aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tccaagttac acatgtcctt
  e a e d l g v y f c l q v t h v p
301 cccacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaacgg (SEQ ID NO:16)
  p t f g a g t k l e l k r (SED ID NO:17)

```

Fig. 13D

SECUENCIA PROTEICA DE VL DE 16G7

```

1 dvvmtqtplslpvsldqasiscrrssqslensngntylnwylqkpgqspq
51 lliyrvsnrfsgvldrfsgsgsgtdftlkisrveaedlgvyfclqvthvp
101 ptfgagtklelkr (SEQ ID NO:17)

```

Fig. 13E

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VL DE 16G7

```

rssqslensngntyln (SEQ ID NO:18)
rvsnrfs (SEQ ID NO:19)
lqvthvppt (SEQ ID NO:20)

```

Fig. 13F

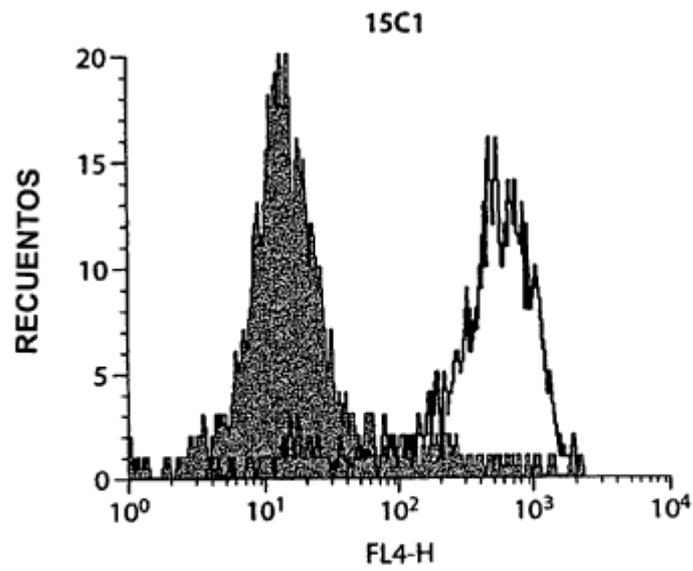


Fig. 14

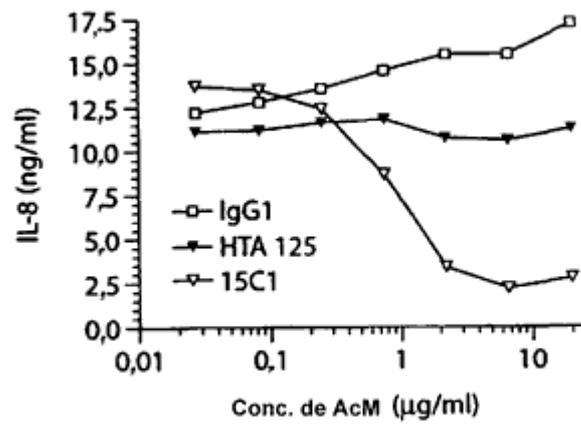


Fig. 15

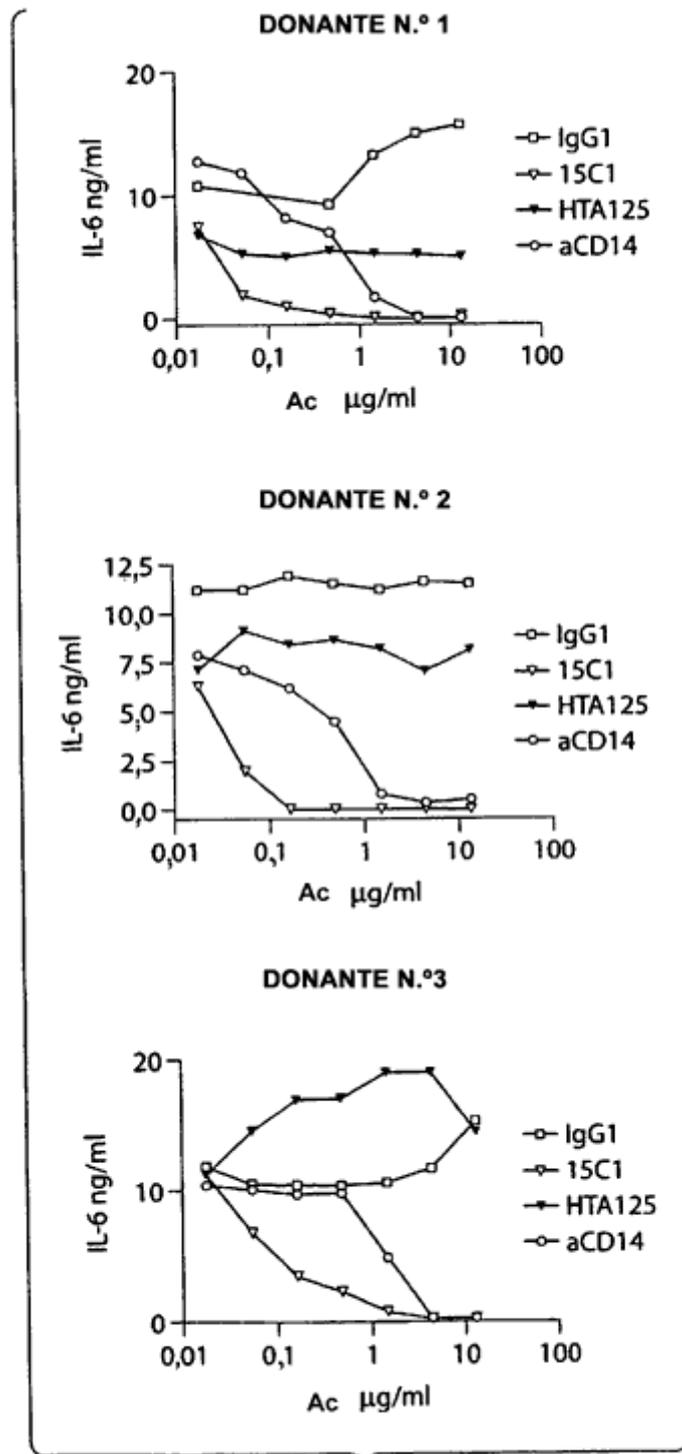


Fig. 16

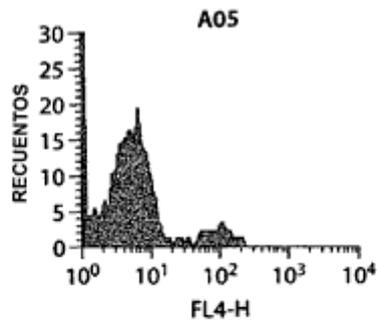


Fig. 17A

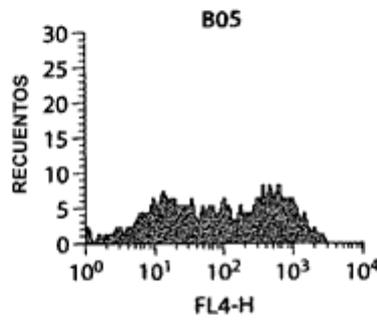


Fig. 17B

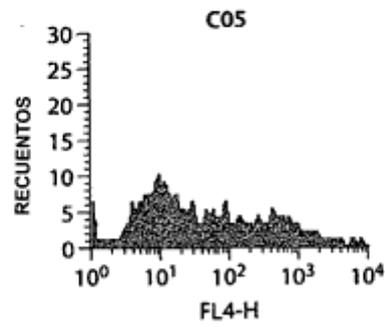


Fig. 17C

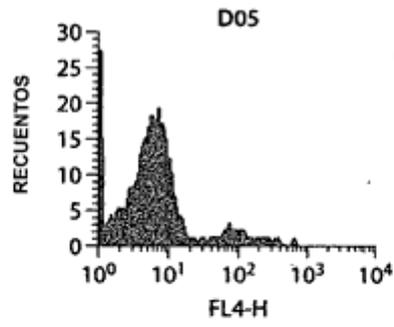


Fig. 17D

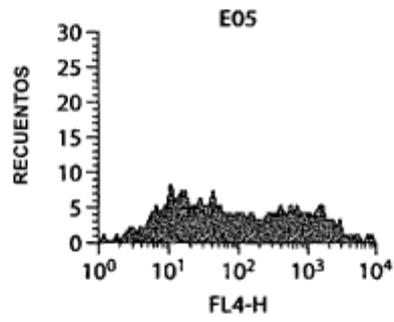


Fig. 17E

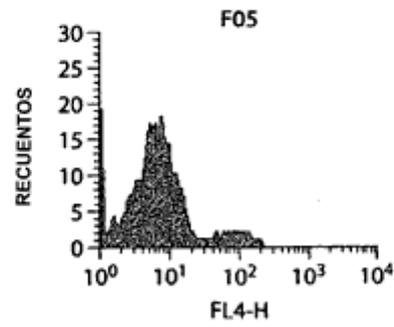


Fig. 17F

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH DE 15C1

```
1 gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctgac ctaatacaac cttctcagtc actttcactc acctgcaactg
  d v q l q e s g p d l i q p s q s l s l t c t
71 tcaactggcta ctccatcacc ggtggttata gctggcactg gatccggcag tttccaggaa acaaactgga
  v t g y s i t g g y s w h w i r q f p g n k l
141 atggatgggc tacatccact acagtggta cactgacttc aaccctctc tcaaaactcg aatctctatc
  e w m g y i h y s g y t d f n p s l k t r i s i
211 actcgagaca catccaagaa ccagttcttc ctgcagttga attctgtgac tactgaagac acagccacat
  t r d t s k n q f f l q l n s v t t e d t a t
281 attactgtgc aagaaaagat cgtccgacg gatttcctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc
  y y c a r k d p s d g f p y w g q g t l v t v
351 tgca (SEQ ID NO:21)
  s a (SEQ ID NO:22)
```

Fig. 18A

SECUENCIA PROTEICA DE VH DE 15C1

```
1 dvqlqesgpd liqpsqslsl tctvtgysit ggyswhwirq fpgnklemwg
51 yihysgytdf npslktrisi trdtsknqff lqlnsvtted tatyycarkd
101 psdgfpywgq gtlvtvsa (SEQ ID NO:22)
```

Fig. 18B

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VH DE 15C1

```
ggyswh (SEQ ID NO:23)
yihysgytdfnpslkt (SEQ ID NO:24)
kdpsdgfpy (SEQ ID NO:25)
```

Fig. 18C

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL DE 15C1

```

1 gacattgtga tgaccagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggtga tagagtctct
  d i v m t q s p a t l s v t p g d r v s
61 ctttctgca gggccagcca gagtatcagc gaccacttac actggtatca acaaaaatca
  l s c r a s q s i s d h l h w y q q k s
121 catgagtctc cacggcttct catcaaatat gcttcccatg ccatttctgg gatcccctcc
  h e s p r l l i k y a s h a i s g i p s
181 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca gcatcaaaag tgtggaacct
  r f s g s g s g t d f t l s i k s v e p
241 gaagatattg ggggtgatta ctgtcaaat ggtcacagtt ttccgctcac gttcgggtgct
  e d i g v y y c q n g h s f p l t f g a
301 gggaccaagc tggagctgaa a (SEQ ID NO:26)
  g t k l e l k (SEQ ID NO:27)

```

Fig. 18D

SECUENCIA PROTEICA DE VL DE 15C1

```

1 divmtqspat lsvtpgdrvs lscrasqsis dhlhwyqqks hesprlliky
51 ashaisgips rfgsgsgtd ftlsiksvep edigvyycqm ghsfpltfga
101 gtklelkr (SEQ ID NO:27)

```

Fig. 18E

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VL DE 15C1

```

rasqsisdhlh (SEQ ID NO:28)
yashais (SEQ ID NO:29)
qnghsfplt (SEQ ID NO:30)

```

Fig. 18F

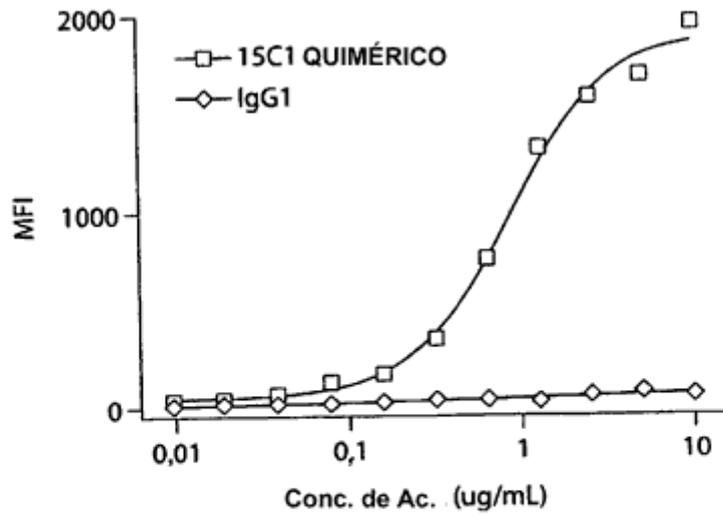


Fig. 19

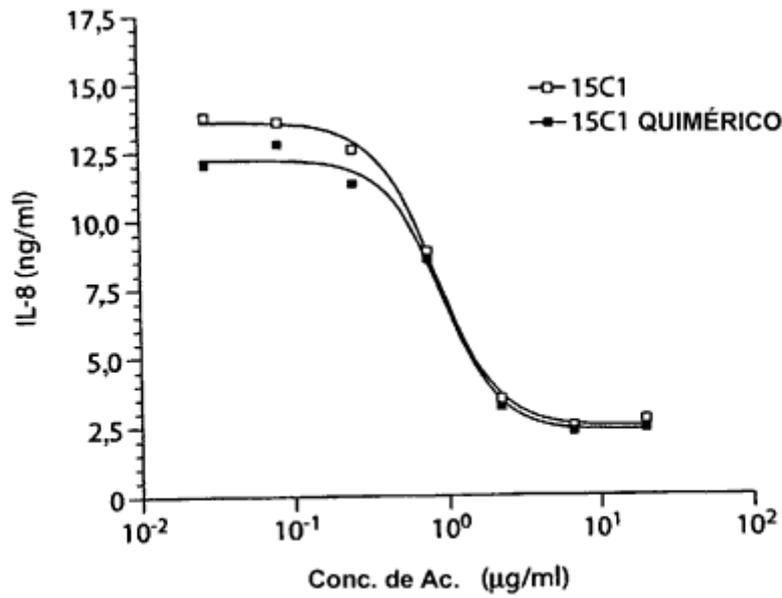


Fig. 20

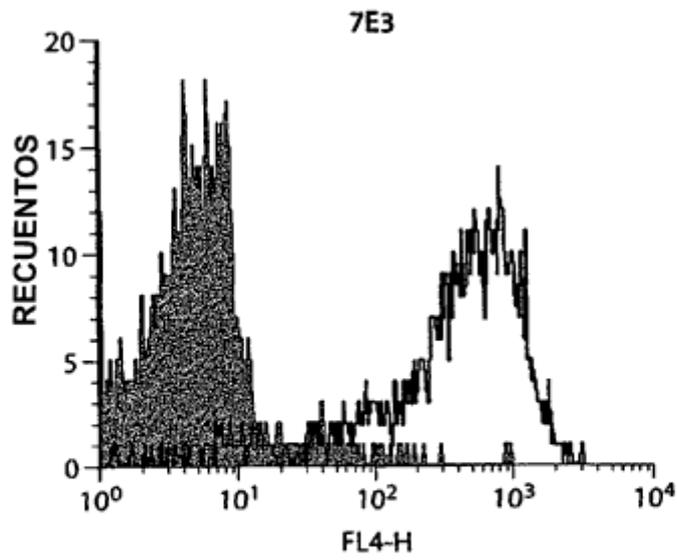


Fig. 21

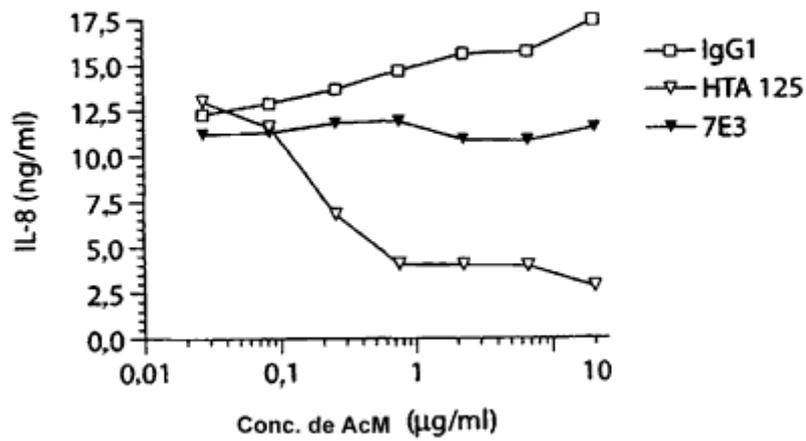


Fig. 22

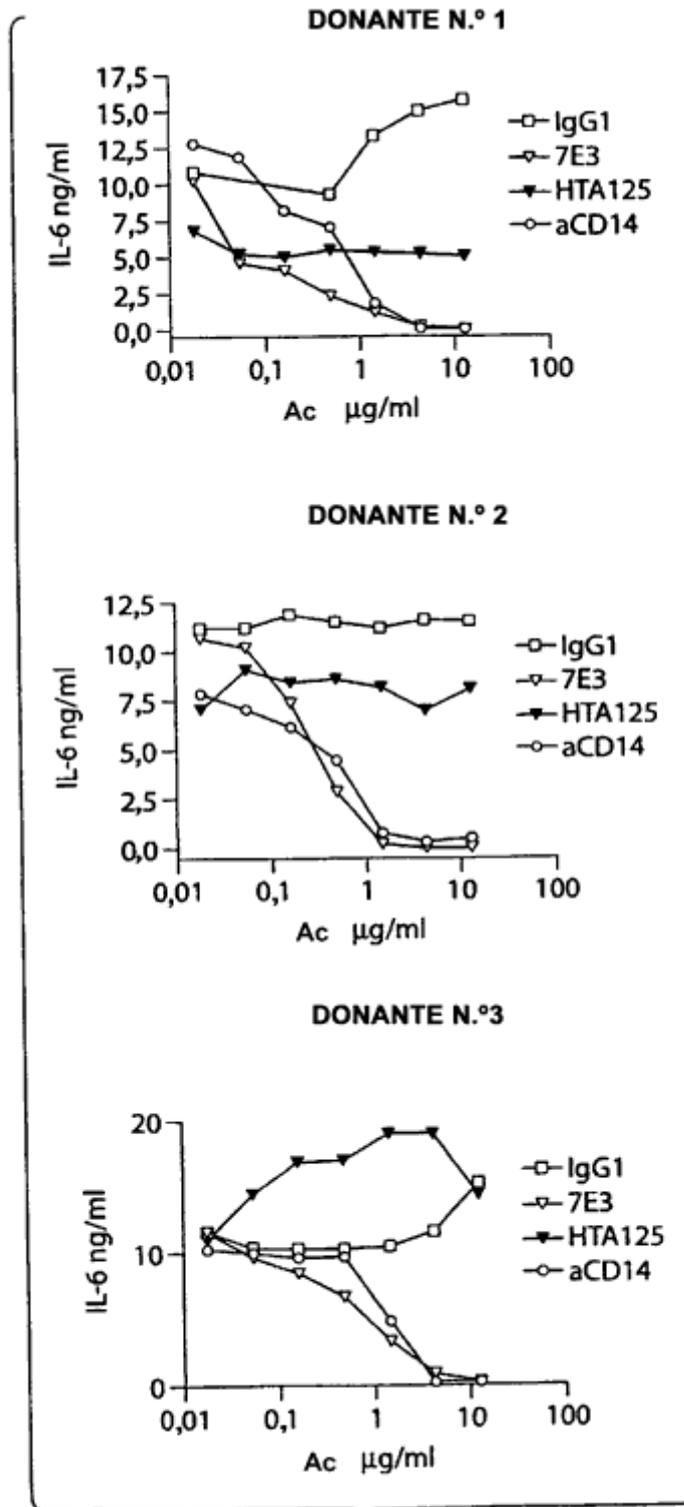


Fig. 23

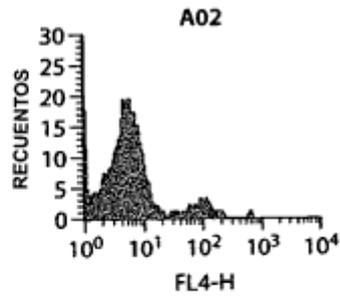


Fig. 24A

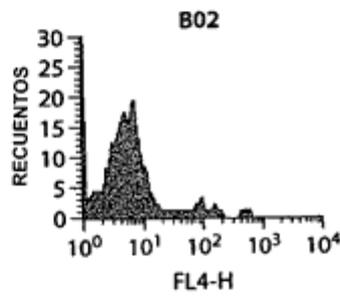


Fig. 24B

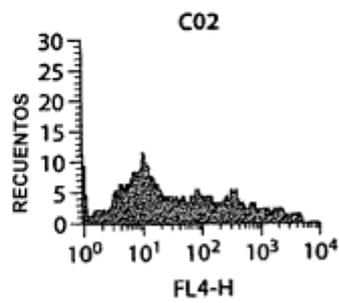


Fig. 24C

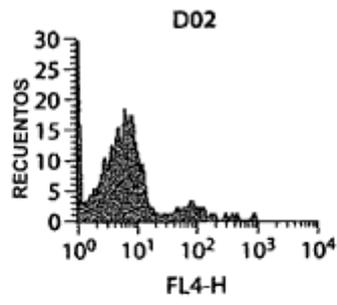


Fig. 24D

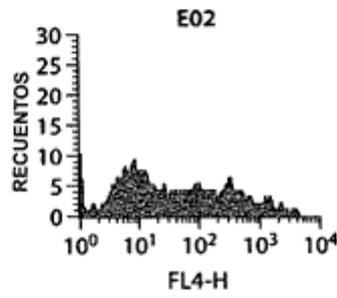


Fig. 24E

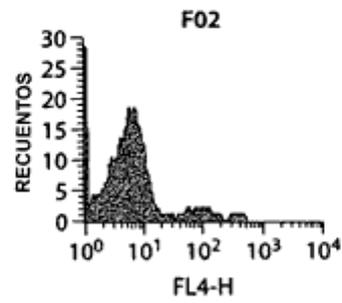


Fig. 24F

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VH DE 7E3

```

1 caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagctg acttgttctt
  q v t l k e s g p g i l q p s q t l s l t c s
71 tctctgggtt ttcactgacc acttataata taggagtagg ctggattcgt cagccttcag ggaagggctc
  f s g f s l t t y n i g v g w i r q p s g k g
141 ggagtgctg gcacacattt ggtggaatga taatatttac tataatacag tccttaagag ccgactcaca
  l e w l a h i w w n d n i y y n t v l k s r l t
211 ttctccaagg atacctccaa caaccaggtt ttctcaaga tcgccagtgt ggacattgca gatactgcca
  f s k d t s n n q v f l k i a s v d i a d t a
281 catattactg tattcgaatg gctgagggaa ggtacgacgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt
  t y y c i r m a e g r y d a m d y w g q g t s
351 caccgtctcc tca (SEQ ID NO:31)
  v t v s s (SEQ ID NO:32)

```

Fig. 25A

SECUENCIA PROTEICA DE VH DE 7E3

```

1 qvtlkesgpg ilqpsqtlsl tcsfsgfslt tynigvgwir qpsgkglewl
51 ahiwwndniy yntvlksrlt fskdtsnnqv flkiasvdia dtatyycirm
101 aegrydamdy wqqgtsvtvs s (SEQ ID NO:32)

```

Fig. 25B

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VH DE 7E3

```

tynigvg (SEQ ID NO:33)
hiwwndniyyntvlks (SEQ ID NO:34)
maegrydamdy (SEQ ID NO:35)

```

Fig. 25C

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE VL DE 7E3

1 gctatccaga tgacacagag tacatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc atcaattgca
 a i q m t q s t s s l s a s l g d r v t i n c
 71 gggcaagtca ggacatcacc aattatttaa attggtatca gcagaaacca gatggaactg tcagactcct
 r a s q d i t n y l n w y q q k p d g t v r l
 141 gatctattat acatcaaaat tacactcagg agcccatca aggttcagtg gccgtgggtc tggaacagat
 l i y y t s k l h s g a p s r f s g r g s g t d
 211 tattctctca ccattagtaa cctggagcaa gaggatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgt
 y s l t i s n l e q e d i a t y f c q q g n t
 281 ttccgtggac gttcgggtga ggcaccaaac tggaaatcaa acgt (SEQ ID NO:36)
 f p w t f g g g t k l e i k r (SEQ ID NO:37)

Fig. 25D

SECUENCIA PROTEICA DE VL DE 7E3

1 aiqmtqstss lsaslgdrvt incrasqdit nylnwyqqkp dgtvrlliyy
 51 tsklhggaps rfsgrgs gtd ysltisnleq ediatyfcqq gntfpwtfgg
 101 gtkleikr (SEQ ID NO:37)

Fig. 25E

SECUENCIAS PROTEICAS DE CDR DE VL DE 7E3

rasqditnyln (SEQ ID NO:38)
 ytsklhs (SEQ ID NO:39)
 qqgntfpwt (SEQ ID NO:40)

Fig. 25F

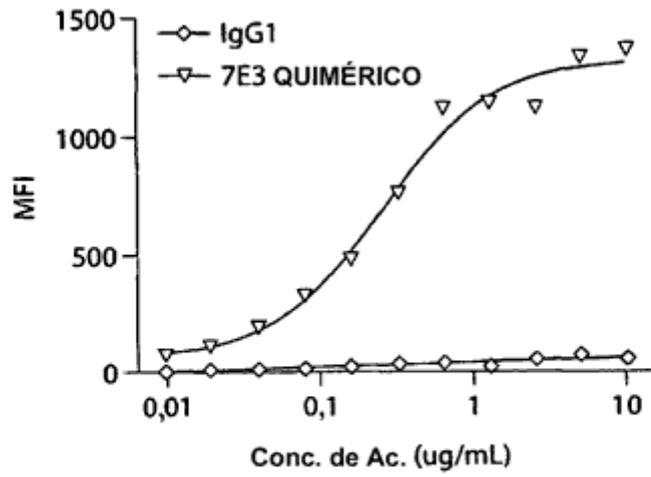


Fig. 26

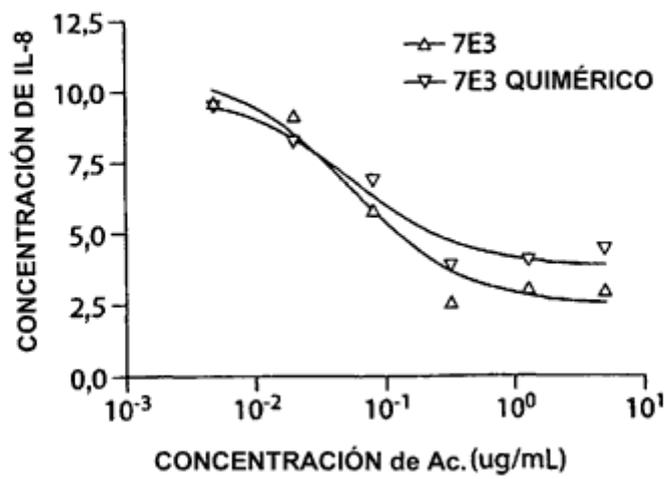


Fig. 27

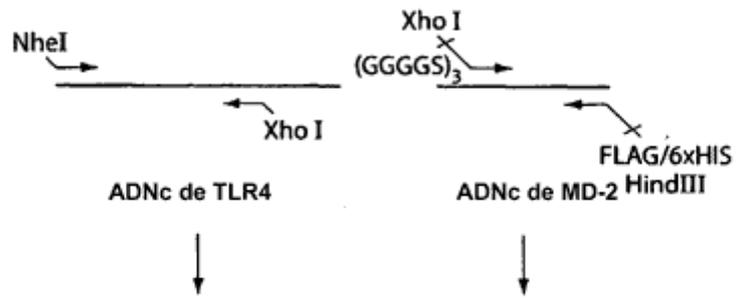


Fig. 28A

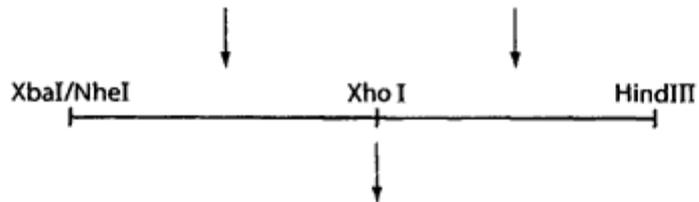


Fig. 28B

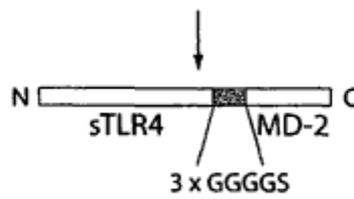


Fig. 28C

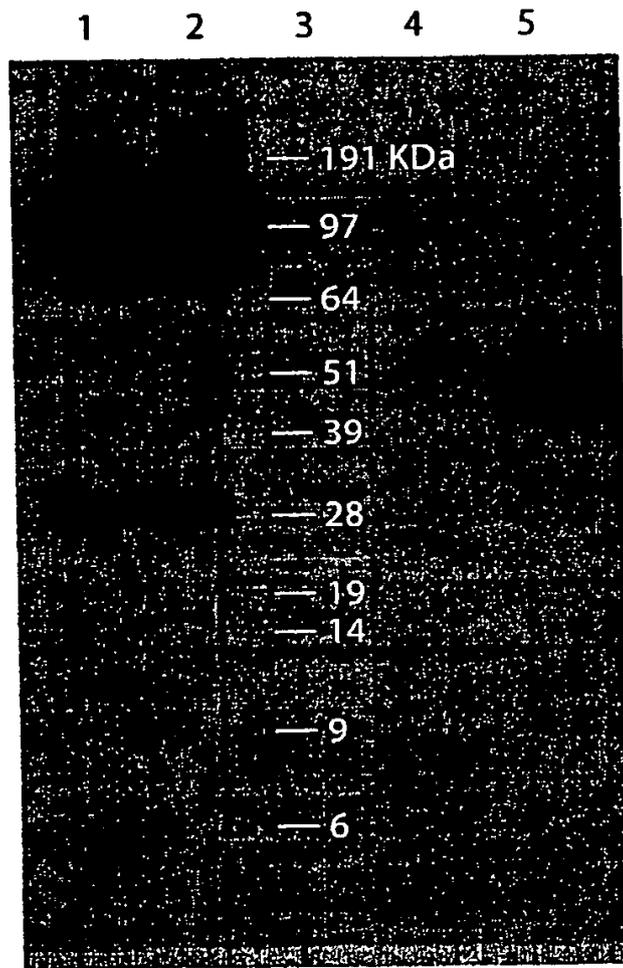


Fig. 29

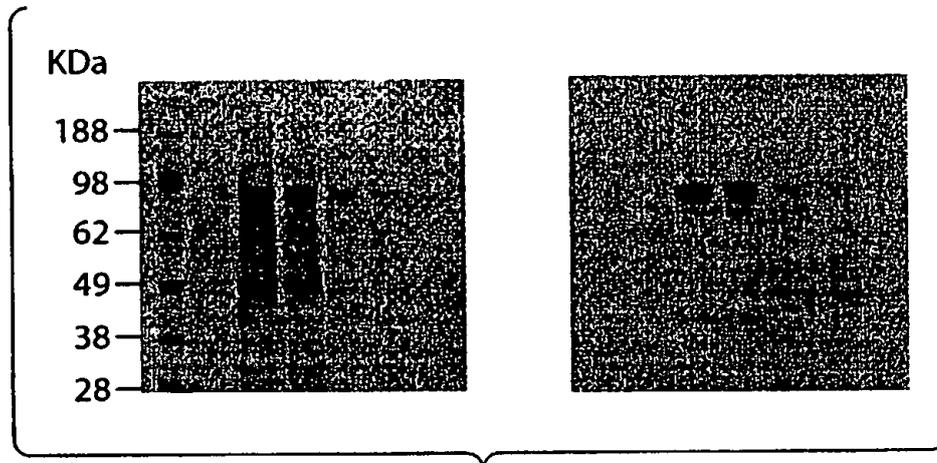


Fig. 30

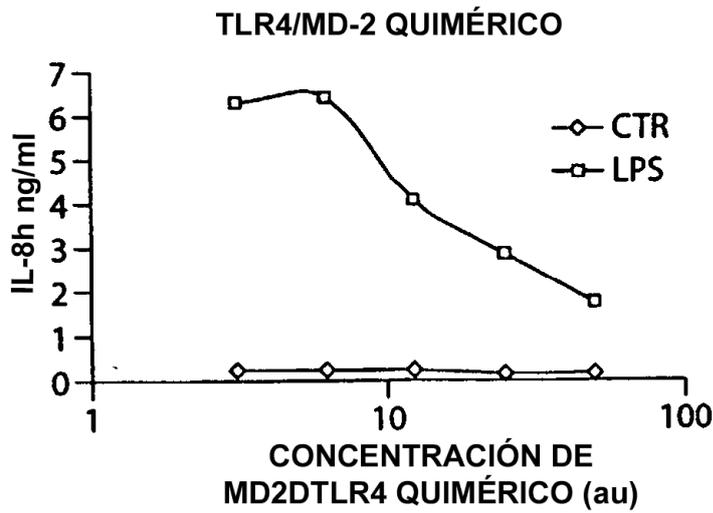


Fig. 31

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE MD-1

```

1  ggcaagagcg gcacgagccc accatgaagg gtttcacagc cactctcttc ctctggactc
61  tgatTTTTcc cagctgcagt ggaggcggcg gtgggaaagc ctggcccaca cacgtgggtc
121  gtagcgacag cggcttgga gTgctctacc agagttgCGa tccattaca gattttggct
181  tttctgttga aaagtgttcc aagcaattaa aatcaaatat caacattaga tttggaatta
241  ttctgagaga ggacatcaaa gagctTTTTc ttgacctagc tctcatgtct caaggctcat
301  ctgTTTTgaa tttctcctat cccatctgtg agggcggctct gcccagttt tctttctgtg
361  gaagaaggaa aggagagcag atttactatg ctgggcctgt caataatcct gaatttacta
421  ttctcaggg agaataccag gttttgctgg aactgtacac tgaaaaacgg tccaccgtgg
481  cctgtgcaa tgctactatc atgtgctcct gactgtggcc tgtagcaaaa atcacagcca
541  gctgcatctc gtgggacctc caagctcctc tgactgaacc tacgtgggag gagaagcagt
601  ctgatgacag agagaggctc taaaaaagc ccccccaaa gagtgcagct gctaatttta
661  gtcccaggac cagacatccc cagactccac agatgtaatg aagccccga atgtatctgt
721  ttctaaggag cctcttgga gtccttaagc agtcttgagg gtccatcctt tttctctaat
781  tggctgcctc ccaccagact cacctgcttt tcaactttt aggagtgtct cctcacagtt
841  accaagaata aagaaagctg gccacc (SEQ ID NO:41)

```

Fig. 32A

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE MD-1

```

1  mkgftatlfl wtlifpscsg ggggkawpth vvcsdsglev lyqscdplqd fgfsvekcsk
61  qlksnirf giilredike lfldlalmgq gssvlnfsyp iceaalpkfs fcgrrkgeqi
121  yyagpvnape ftipqgeyqv llelytekrs tvacanatim cs (SEQ ID NO:42)

```

Fig. 32B

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE MD-2

```
1   ggcgggcccgc tcccacttcg gcacgagggg cacgaggtaa atcttttctg ettactgaaa
61  aggaagagtc tgatgattag ttactgatcc tctttgcatt tgtaaagctt tggagatatt
121 gaatcatggt accatttctg ttttttcca cctgttttc ttccatattt actgaagctc
181 agaagcagta ttgggtctgc aactcatccg atgcaagtat ttcatacacc tactgtgata
241 aaatgcaata cccaatttca attaatgta acccctgtat agaattgaaa ggatccaaag
301 gattattgca cattttctac attccaagga gagatttaa gcaattatat ttcaatctct
361 atataactgt caacaccatg aatcttcaa agcgcaaaga agttatttgc cgaggatctg
421 atgacgatta ctctttttgc agagctctga agggagagac tgtgaataca acaatatcat
481 tctccttcaa gggataaaa ttttctaagg gaaaatacaa atgtgttgtt gaagctattt
541 ctgggagccc agaagaaatg ctcttttctg tggagtttgt catcctacac caacctaatt
601 caaattagaa taaattgagt attt (SEQ ID NO:43)
```

Fig. 33A

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE MD-2

```
1   MLPFLFFSTL FSSIFTEAQR QYWVCNSSDA SISYTYCDKM QYPISINVNP CIELKGSKGL
61  LHIFYIPRRD LKQLYFNLYI TVNTMNLPKR KEVICRGSDD DYSFCRALKG ETVNTTISFS
121 FKGIFSRGK  YKCVVEAISG SPEEMLFCLE FVILHQPNSN (SEQ ID NO:44)
```

Fig. 33B