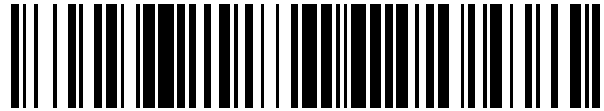


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 775**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 06846174 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1945820**

54 Título: **Moduladores de receptor tipo Toll 3, procedimientos y usos**

30 Prioridad:

**27.10.2005 US 730793 P**

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

**23.12.2013**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
800/850 Ridgeview Drive  
Horsham, PA 19044 , US**

72 Inventor/es:

**DUFFY, KAREN, E.;  
HUANG, CHONG, C.;  
LAMB, ROBERTA;  
MBOW, MOUHAMADOU, L.;  
SARISKY, ROBERT, T. y  
SAN, MATEO, LANI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 435 775 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**

Moduladores de receptor tipo Toll 3, procedimientos y usos

5 **Antecedentes de la invención**

El reconocimiento de antígenos extraños por células de mamífero puede estar mediado por un conjunto de receptores inmunes innatos llamados receptores tipo Toll (TLR), véanse los documentos EP 1 887 014, US 2005/112659 y US 2005/158799. Los TLR reconocen patrones conservados derivados de patógenos microbianos identificados como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) (Barton y col., Science 300:1524-1525, 2003). La interacción de un TLR con una PAMP produce una cascada de señalización que implica la activación de NF- $\kappa$ B y la transcripción de la expresión génica de citocinas. Se han identificado diez receptores tipo Toll humanos y cinco proteínas adaptadoras de TLR.

15 Los TLR pueden expandir su repertorio de ligandos formando homo- o heterodímeros, además de unirse a diferentes proteínas adaptadoras. Por ejemplo, TLR3 se une a ARNbc, un producto intermedio en la replicación viral. TLR3 también interactúa con PolyI:C, un análogo de ARNbc sintético, y ARNm de células necróticas. La activación de TLR3 conduce a la secreción de interferones tipo I, que son importantes en el control de la infección viral. Una secuencia de aminoácidos de TLR3 humano de longitud completa y la secuencia de polinucleótidos codificante se muestran en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente. Los TLR TLR7, TLR8 y TLR9 también tienen ligandos de ácido nucleico; la activación de estos TLR también puede conducir a la secreción de interferón.

Los interferones tipo I desencadenan cascadas de señalización para activar un conjunto de genes de respuesta temprana inmediata (genes estimulados por IFN o ISG) y han demostrado ser útiles en la clínica, véase el documento US 2004 091491. Las actividades antivirales resultantes incluyen inhibición de la traducción de ARNm, edición de ARN y degradación de ARN (Samuel y col., Clin Microbiol Rev 14:778-809, 2001, y Bhattacharjee y col. Curr. Immunol. Rev 1: 81-90, 2005). Actualmente está siendo usada una terapia de combinación de interferón PEGilado y el compuesto antiviral de amplio espectro ribavirina para tratar infección por hepatitis C (Manns y col., Lancet 358:958-965, 2001).

La función antiviral crítica de IFN de tipo I se demuestra adicionalmente por la evolución de mecanismos de resistencia viral para inhibir la producción de IFN tipo I por células huésped infectadas. Por ejemplo, la proteína NS1 de la gripe antagoniza la activación de IRF-3 y producción de IFN $\beta$  (Donelan y col., J Virol 78: 11574-11582, 2004) y la proteína del virus de la viruela A52R se asocia con IRAK2 y TRAF6 para bloquear la señalización aguas abajo de TLR3 (Harte y col., J Exp Med, 197:343-351, 2003). Así, terapias basadas en provocar la activación de TLR o el potenciamiento de rutas de señalización mediadas por TLR aumentan la producción de IFN $\alpha/\beta$  endógeno y ayudan al huésped en el control de infecciones virales agudas.

El uso de agonistas de TLR para modular el resultado de una respuesta inmunitaria está siendo actualmente investigado para uso terapéutico (O'Neill, Curr Opin Pharm 3:396-403, 2003; Schetter y col., Curr Opin Drug Discov Devel 7:204-210, 2004). Por ejemplo, oligodinucleótidos (ODN) de CpG, un ligando de TLR9, pueden estimular la producción de IFN tipo I y una respuesta de T<sub>H</sub>1 (Krieg, Annu Rev Immunol 20:709-60, 2002), un hallazgo que sugiere el posible uso de ODN de CpG no solo como un adyuvante de vacuna, sino también para el tratamiento y o prevención de enfermedades que necesitan una potente respuesta de T<sub>H</sub>1. Otro ejemplo es el agonista de TLR7 sintético imiquimod, un agente aprobado para el tratamiento de condilomas acuminados; se cree que su efecto protector está mediado por la estimulación de citocinas inflamatorias tales como IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$  (Saunders, J Amer Acad Derm 43: S6-S11, 2000). En general, estos hallazgos muestran que los agonistas de TLR son una clase novedosa de agentes inmunomoduladores con el potencial de tener un beneficio terapéutico significativo.

Así, existe la necesidad de identificación de novedosos agentes inmunomoduladores que potencien el efecto de agonistas de TLR. Se espera que tales terapias novedosas basadas en TLR tengan una ventaja en proporcionar una respuesta inmunitaria sostenida con pautas de dosificación menos frecuentes.

55 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra secuencias de la región variable de la cadena pesada del mAb anti-hTLR3 C1130.

La Fig. 2 muestra secuencias de la región variable de la cadena ligera del mAb anti-hTLR3 C1130.

La Fig. 3 muestra la secreción de IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES y TNF $\alpha$  inducida por C1130 por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas a 24 h.

La Fig. 4 muestra que C1130 potenció la producción de IFN $\alpha$  inducida por CpG a 24 h.

La Fig. 5 muestra que C1130 disminuyó la producción de IL-10 inducida por R848 a 24 h.

La Fig. 6 muestra el reconocimiento por C1130 de TLR3 de la superficie celular sobre células HEK293 establemente transfectadas.

La Fig. 7 muestra el reconocimiento por C1130 de TLR3 de la superficie celular sobre células A549-TLR3.2 establemente transfectadas.

La Fig. 8 muestra el reconocimiento por C1130 de CMSP de macaco cinomolgo.

**Resumen de la invención**

- 5 Un aspecto de la divulgación es un anticuerpo aislado reactivo con receptor tipo Toll 3 humano (hTLR3) o sus homólogos que induce la producción celular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , RANTES y TNF- $\alpha$ .
- Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 o sus homólogos que modifica una respuesta inmunitaria a otros ligando de receptores tipo Toll.
- 10 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 que tiene la capacidad de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada como se muestra en SEC ID N°: 9, 11 y 13 y las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera como se muestra en SEC ID N°: 19, 21 y 23.
- 15 Un aspecto de la invención es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada como se muestra en SEC ID N°: 9, 11 y 13 y las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera como se muestra en SEC ID N°: 19, 21 y 23.
- 20 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16.
- 25 Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada del anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°: 9, 11 y 13.
- Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera del anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°: 19, 21 y 23.
- 30 Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6.
- Otro aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16.
- 35 Otros aspectos de la divulgación incluyen procedimientos para tratar o prevenir infección viral que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un inmunoestimulante.
- 40 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un inmunoestimulante.
- Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar enfermedad inflamatoria del intestino que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un inmunoestimulante.
- 45 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar enfermedad inflamatoria del intestino que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un inmunoestimulante.
- 50 Otros aspectos de la divulgación incluyen procedimientos para tratar o prevenir un síntoma asociado a infección viral que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un agonista de receptor tipo Toll 7 (TLR7).
- Otros aspectos de la divulgación incluyen procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar y exacerbación mediada por patógenos que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un agonista de TLR9 o TLR7.
- 55 Otros aspectos de la divulgación incluyen procedimientos para tratar o prevenir enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD) que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un agonista de TLR9 o TLR7.
- 60 Otros aspectos de la divulgación incluyen procedimientos para tratar o prevenir enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención en combinación con un tratamiento inmunológico.

**Descripción detallada de la invención**

- 65 El término “anticuerpos” como se usa en el presente documento se indica en un amplio sentido e incluye inmunoglobulina o moléculas de anticuerpo que incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales que

incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, y fragmentos de anticuerpos.

En general, los anticuerpos son proteínas o polipéptidos que presentan especificidad de unión por un antígeno específico. Los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre las cadenas regularmente separadas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo ( $V_L$ ) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, concretamente kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, concretamente IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. IgA y IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> y IgG<sub>4</sub>.

El término "fragmentos de anticuerpos" significa una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos.

El término "antígeno" como se usa en el presente documento significa cualquier molécula que tenga la capacidad para generar anticuerpos tanto directamente como indirectamente. Dentro de la definición de "antígeno" se incluye un ácido nucleico que codifica proteína.

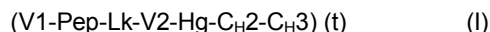
Las "CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4<sup>a</sup> ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR o regiones CDR de la cadena pesada y tres de la cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Así, "CDR" como se usa en el presente documento se refiere a las tres CDR de la cadena pesada, o a las tres CDR de la cadena ligera, o tanto a todas las CDR de la cadena pesada como a todas las CDR de la cadena ligera, si es apropiado.

Las CDR proporcionan la mayoría de los residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítipo. Las CDR de interés en la presente invención se derivan de secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables de anticuerpos donantes e incluyen análogos de las CDR que se producen naturalmente, análogos que también comparten o retienen la misma especificidad de unión a antígeno y/o capacidad neutralizante que el anticuerpo donante del que se derivaron.

El término "homólogo" significa secuencias de proteína que tienen entre el 40% y el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de referencia. Los homólogos de hTLR3 incluyen polipéptidos de otras especies que tienen entre el 40% y el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de hTLR3 conocida. La identidad en porcentaje entre dos cadenas de péptidos puede determinarse por alineamiento por emparejamiento usando los parámetros por defecto del módulo AlignX de Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

El término "en combinación con" como se usa en el presente documento significa que los agentes descritos pueden administrarse a un animal juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes individuales o secuencialmente como agentes individuales en cualquier orden.

El término "mimeticuerpo" como se usa en el presente documento significa una proteína que tiene la fórmula genérica (I):



en la que V1 es una parte de un extremo N de una región variable de inmunoglobulina, Pep es un polipéptido que se une a TLR3 de la superficie celular, Lk es un polipéptido o enlace químico, V2 es una parte de un extremo C de una región variable de inmunoglobulina, Hg es una parte de una región bisagra de inmunoglobulina, C<sub>H2</sub> es una cadena pesada de la región constante C<sub>H2</sub> de la inmunoglobulina y C<sub>H3</sub> es una cadena pesada de la región constante C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina y t es independientemente un número entero de 1 a 10. Un mimeticuerpo puede imitar propiedades y funciones de diferentes tipos de moléculas de inmunoglobulina tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgM, IgD e IgE dependientes de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada presente en la construcción. En algunas realizaciones de mimeticuerpos, V1 puede estar ausente. Un mimeticuerpo desvelado en el presente documento modula la actividad biológica de TLR mediante la unión a células que expresan TLR.

El término “anticuerpo monoclonal” (mAb) como se usa en el presente documento significa un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando normalmente dirigidos contra un único determinante antigénico. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter sustancialmente homogéneo del anticuerpo y no requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los mAb murinos pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma de Kohler y col., *Nature* 256:495-497 (1975). Los mAb quiméricos que contienen una región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada derivada de un anticuerpo donante (normalmente murino) en asociación con regiones constantes de la cadena ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor (normalmente otra especie de mamífero tal como ser humano) pueden prepararse mediante el procedimiento desvelado en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. Los mAb humanizados que tienen CDR derivadas de una inmunoglobulina donante no humana (normalmente murina) y las restantes partes derivadas de inmunoglobulina de la molécula que se deriva de una o más inmunoglobulinas humanas, que tienen opcionalmente residuos de soporte de la región estructural alterados para preservar la afinidad de unión, pueden obtenerse por las técnicas desveladas en Queen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:10029-10032 (1989) y Hodgson y col., *Bio/Technology*, 9:421 (1991).

Secuencias de la región estructural humana a modo de ejemplo útiles para humanización se desvelan en, por ejemplo,

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nih.gov/igblast;  
 www.atcc.org/phage/hdb.html;  
 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php;  
 www.kabatdatabase.com/top.html;  
 ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat; www.sciquest.com;  
 www.abcam.com; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;  
 www.public.iastate.edu/~pedro/research\_tools.html;  
 www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;  
 www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab;  
 www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;  
 mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;  
 www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;  
 www.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody;  
 www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com;  
 www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu;  
 www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;  
 www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu; www.mrc-cpe.cam.ac.uk;  
 www.ibt.unam.mx/vir/V\_mice.html; http://www.bioinf.org.uk/abs;  
 antibody.bath.ac.uk; www.unizh.ch;  
 www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s;  
 www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html;  
 www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;  
 www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\_aim.html;  
 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de;  
 imgt.cines.fr; y Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. Health (1987).

Pueden prepararse mAb completamente humanos que carecen de cualquier secuencia no humana a partir de ratones transgénicos de inmunoglobulina humana por técnicas citadas en, por ejemplo, Lonberg y col., *Nature* 368:856-859 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996) y Mendez y col., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997). También pueden prepararse y optimizarse mAb humanos de bibliotecas de expresión en fago por técnicas citadas en, por ejemplo, Knappik y col., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000) y Krebs y col., *J. Immunol. Meth.* 254:67-84 (2001).

La presente divulgación se refiere a agentes de unión a receptores TLR3 que pueden modular la señalización mediada por receptores TLR3. Tales agentes de unión incluyen anticuerpos anti-TLR3 que tienen las propiedades de unirse a un receptor TLR3 y modular la señalización mediada por receptores TLR3.

Un aspecto de la divulgación es un anticuerpo reactivo con receptor tipo Toll 3 humano (hTLR3) u homólogos de hTLR3 que inducen producción celular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , RANTES y TNF- $\alpha$ . Estos anticuerpos son útiles como reactivos de investigación, reactivos de diagnóstico y agentes terapéuticos. En particular, los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos que pueden estimular una respuesta inmunitaria contra antígenos extraños.

Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo reactivo con hTLR3 u homólogos de TLR3 que modula una respuesta de citocinas inducida por otros ligandos de TLR. La modulación de una respuesta de citocina produce potenciación o modificación de la respuesta inmunitaria a otros ligandos de TLR que incluyen ODN de Cpg y R848. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden potenciar la producción de interferones tipo 1 tales como

interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) cuando se usan en combinación con ligandos de TLR9 tales como oligodinucleótidos de CpG (ODN de CpG).

Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo reactivo con TLR3 u homólogos de hTLR3 que disminuye la producción de IL-10 producida por agonistas de TLR7. Por ejemplo, los anticuerpos desvelados en el presente documento disminuyen significativamente la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 producida por el agonista de TLR7 R848, también conocido como resiquimod. Aunque no se desea quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que los anticuerpos desvelados en el presente documento potencian la respuesta inflamatoria a agonistas de TLR7.

En una realización, el anticuerpo desvelado en el presente documento es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 que tiene la capacidad de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada como se exponen en SEC ID N°: 9 (CDR H1), 11 (CDR H2) y 13 (CDR H3) y las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera como se muestran en SEC ID N°: 19 (CDR L1), 21 (CDR L2) y 23 (CDR L3). Un anticuerpo a modo de ejemplo es un anticuerpo monoclonal que tiene secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena pesada como se muestran en SEC ID N°: 9, 11 y 13 y secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena ligera como se muestran en SEC ID N°: 19, 21 y 23.

Otra realización de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°: 9, 11 y 13 o un ácido nucleico complementario. También están dentro del alcance de la invención otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican las CDR de la región variable de la cadena pesada mostradas en SEC ID N°: 9, 11 y 13.

Otra realización de la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°: 19, 21 y 23 o un ácido nucleico complementario. También están dentro del alcance de la invención otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican la región variable de las CDR de la cadena ligera mostrada en SEC ID N°: 19, 21 y 23.

Otra realización de la invención es un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3 que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16.

Otra realización de la invención es un polinucleótido aislado que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6 o su complemento. Un polinucleótido a modo de ejemplo que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6 tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 5.

Otra realización de la invención es un polinucleótido aislado que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16 o su complemento. Un polinucleótido a modo de ejemplo que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16 tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 15.

Anticuerpos a modo de ejemplo pueden ser anticuerpos de los isotipos IgG, IgD, IgA o IgM. Adicionalmente, tales anticuerpos pueden modificarse postraduccionalmente mediante procedimientos tales como glucosilación, isomerización, aglucosilación o modificación covalente que no se produce naturalmente tal como la adición de restos de polietilenglicol (PEGilación) y lipidación. Tales modificaciones pueden producirse *in vivo* o *in vitro*. Moléculas de anticuerpo completamente humanas, humanizadas y maduras por afinidad o fragmentos de anticuerpos están dentro del alcance de la invención, ya que son mimeticuerpos, proteínas de fusión y proteínas quiméricas.

El anticuerpo de la invención puede unirse a hTLR3 con una  $K_d$  inferior a o igual a aproximadamente  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  ó  $10^{-12}$  M. La afinidad de una molécula dada por un receptor hTLR3 puede determinarse experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado. Tales procedimientos pueden utilizar instrumentación Biacore o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos para aquellos expertos en la materia.

Las moléculas de anticuerpo que se unen a un homólogo de TLR3 dado con una afinidad deseada pueden seleccionarse de bibliotecas de variantes o fragmentos por técnicas que incluyen maduración por afinidad de anticuerpos y otras técnicas reconocidas en la materia adecuadas para moléculas de no anticuerpo.

Otra realización de la invención es un vector que comprende al menos un polinucleótido de la invención. Tales vectores pueden ser vectores de plásmido, vectores virales, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la introducción de los polinucleótidos de la invención en un organismo dado o población genética mediante cualquier medio.

Otra realización de la invención es una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 11 y SEC

ID N°: 13 y un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 23. Tales células huésped pueden ser células eucariotas, células bacterianas, células vegetales o células arqueas. Células eucariotas a modo de ejemplo pueden ser de mamífero, insecto, aves u otros orígenes animales. Las células eucariotas de mamífero incluyen líneas celulares inmortalizadas tales como hibridomas o líneas de células de mieloma tales como las líneas celulares murinas SP2/0 (Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (Colección europea de cultivos celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, RU, ECACC n° 85110503), FO (ATCC CRL-1646) y Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea de células de mieloma humano a modo de ejemplo es U266 (ATCC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen aquellas derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO) tales como CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

Otra realización de la invención es un procedimiento de preparación de un anticuerpo de la invención que comprende cultivar una célula huésped de la invención y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped. Un anticuerpo tal puede ser el anticuerpo para hTLR3 ejemplificado más adelante como el mAb C1130 que tiene secuencias de aminoácidos pesadas y ligeras como se muestra en SEC ID N°: 6 y 16, respectivamente

La capacidad de los anticuerpos desvelados en el presente documento para potenciar la producción de IFN- $\alpha$  mediada por CpG proporciona diversas terapias de tipo combinación. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con antígenos extraños tales como moléculas agonistas de TLR o antígenos de vacuna modulará una respuesta inmunitaria y serán útiles en el tratamiento de infecciones. Así, otro aspecto de la divulgación es el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con otros inmunoestimulantes tales como interferón o agonistas de TLR9 que incluyen, pero no se limitan a, ODN de CpG para estimular y mantener una respuesta inmunitaria como se mide por la producción potenciada de IFN tipo I (por ejemplo, IFN $\alpha$ ) para prevenir o tratar infecciones virales que incluyen virus de la hepatitis, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana y virus del papiloma humano, y otras infecciones cutáneas y asociadas a la mucosa. Por tanto, se desvela el de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con otros inmunoestimulantes tales como interferón o agonistas de TLR9 que incluyen, pero no se limitan a, ODN de CpG para tratar cánceres que incluyen mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, melanoma maligno y sarcomas (incluyendo sarcoma de Kaposi). Además, la divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con otros inmunoestimulantes tales como interferón o agonistas de TLR9 que incluyen, pero no se limitan a, ODN de CpG para tratar enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa).

Otro aspecto de la divulgación es el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con un agonista de TLR7 tal como R848 (resiquimod) o imiquimod para proporcionar una terapia de combinación para prevenir o tratar síntomas asociados a infección viral tales como condilomas acuminados. El agonista de TLR7 sintético imiquimod ha sido aprobado por las autoridades reguladoras para el tratamiento de condilomas acuminados. Otro aspecto de la divulgación es el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con agonistas de TLR9 o de TLR7 para prevenir o tratar enfermedades pulmonares que incluyen neumonías bacterianas, fúngicas y virales, y exacerbación mediada por patógenos de enfermedades pulmonares tales como asma, bronquitis y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Todavía otro aspecto de la divulgación es el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con agonistas de TLR9 o de TLR7 para prevenir o tratar enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD). Todavía otro aspecto de la divulgación es el uso de un anticuerpo desvelado en el presente documento en combinación con tratamientos inmunes tales como interferón, para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias, que incluyen esclerosis múltiple y lupus.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para tratar un animal que pertenece a cualquier género. Ejemplos de tales animales incluyen seres humanos, ratones, aves, reptiles y peces.

Cantidades de un anticuerpo para TLR3 dado suficientes para tratar una afección dada pueden determinarse fácilmente. En el procedimiento desvelado en el presente documento, el anticuerpo para TLR3 puede administrarse individualmente o en combinación con al menos otra molécula de agonista de TLR o antígeno de vacuna.

El modo de administración para uso terapéutico de los anticuerpos de la invención puede ser cualquier vía adecuada que administre el agente al huésped. Las proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y mimeticuerpos, y composiciones farmacéuticas de estos agentes, son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, subcutáneamente, intramuscularmente, intradérmicamente, intravenosamente o intranasalmente.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del anticuerpo como principio activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se prefiere una suspensión o disolución acuosa que contiene el anticuerpo, preferentemente tamponada a pH fisiológico, en una forma lista para inyección. Las composiciones para administración parenteral comprenderán comúnmente una disolución del anticuerpo desvelado en el presente documento o una mezcla de los mismos disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Puede emplearse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, 0,4% de solución salina, 0,3% de glicina y similares. Estas disoluciones son estériles y generalmente están libres de materia particulada. Estas disoluciones pueden esterilizarse por

técnicas de esterilización convencionales muy conocidas (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, etc. La concentración del anticuerpo desvelado en el presente documento en tal formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,5%, normalmente a o al menos aproximadamente el 1%, a como mucho al 15 o 20% en peso, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado.

Así, una composición farmacéutica desvelada en el presente documento para inyección intramuscular podría prepararse para contener 1 ml de agua tamponada estéril, y entre aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg, por ejemplo, aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg, o más preferentemente, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, de un anticuerpo de la invención. Similarmente, una composición farmacéutica desvelada en el presente documento para infusión intravenosa podría prepararse para contener aproximadamente 250 ml de disolución de Ringer estéril, y aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg y preferentemente 5 mg a aproximadamente 25 mg de un anticuerpo como se desvela en el presente documento. Procedimientos actuales para preparar composiciones parenteralmente administrables son muy conocidos y se describen en más detalle en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento, cuando están en una preparación farmacéutica, pueden estar presentes en formas de dosis unitaria. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada puede determinarse fácilmente por aquellos expertos en la materia. Una dosis determinada puede repetirse, si fuera necesario, a intervalos de tiempo apropiados seleccionados según convenga por un médico durante el periodo de tratamiento.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de uso. Esta técnica se ha mostrado que es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y preparaciones de proteína, y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes específicos.

### **Ejemplo 1**

#### **Generación de mAb anti-TLR3**

El mAb anti-TLR3 se generó usando tecnología de hibridomas convencional en ratones Balb/c normales (Kohler y col., J Immunol 6:511-519, 1976). Todos los procedimientos en animales se realizaron según las pautas establecidas por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales. Los ratones se inyectaron intradérmicamente dos veces con ADN de plásmido que codifica los aminoácidos 1-703 de TLR3 humano (SEC ID N°: 3). Los aminoácidos 1-703 se corresponden con el dominio extracelular predicho de TLR3 (SEC ID N°: 4). Los ratones recibieron las inyecciones de ADN de plásmido de 10 pg/ratón separadas dos semanas. Los ratones se reforzaron por inyección intradérmica con el dominio extracelular de la proteína TLR3 humana recombinante purificada. La primera y segunda inmunizaciones con proteína, con 15 µg de proteína, se produjeron dos y cuatro semanas después de la segunda inyección de ADN de plásmido. El tercer refuerzo (10 µg de proteína) se produjo cinco meses después. Tres días antes de la recogida de los bazos, los ratones se inyectaron intravenosamente con la proteína TLR3 (15 µg/ratón). Se realizaron fusiones de linfocitos B usando procedimientos convencionales (Kohler y col., arriba). Se seleccionaron hibridomas usando medio que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina. Los pocillos se cribaron por ELISA para detectar anticuerpos anti-TLR3. Los pocillos positivos se expandieron y se clonaron usando dilución limitante. Se preparó un gran lote de anticuerpo y se purificó usando una columna de proteína G. Se confirmó que los niveles de endotoxina eran <1 UE/mg. De este modo se generó el mAb C1130. La secuencia de anticuerpos se muestra en las Fig. 1 y 2.

### **Ejemplo 2**

#### **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana**

Se aislaron CMSP de sangre humana. La sangre completa se recogió de un donante humano en jeringuillas recubiertas con heparina. Se añadieron aproximadamente 50 ml de disolución salina estéril equilibrada con Hank (HBSS) (Invitrogen) cada 100 ml de sangre. Se añadieron treinta y ocho ml de sangre:HBSS a un tubo cónico de 50 ml y debajo se estratificaron lentamente 11 ml de disolución Ficoll-Paque Plus (Amersham). Los tubos se centrifugaron a 400 x g durante 40 minutos a temperatura ambiente. El freno centrífugo se apagó para preservar el gradiente. Las CMSP forman una capa blanca justamente encima de Ficoll. Las CMSP de un cónico se aspiraron con una pipeta en un cónico nuevo de 50 ml. El tubo se llenó con HBSS para lavar el resto de Ficoll. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se vertió y el sedimento se resuspendió en 10 ml de disolución de lisis de glóbulos rojos (Sigma) en un único tubo. El tubo se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos. El tubo se enrasó a 50 ml con HBSS y las células se sedimentaron por centrifugación a 600 x g. Las células se lavaron dos veces más con HBSS. Después del lavado final, el sedimento se resuspendió en medio completo:



medio RPMI 1640/ 10% de SBF/ 1X aminoácidos no esenciales/ 1X piruvato de sodio/ 10 ug/ml de gentamicina. La gentamicina se compró de Sigma; los otros componentes del medio se compraron de Invitrogen. Se extrajo una alícuota de las células y se mezcló con 50 µl de azul de tripano para obtener una cifra de células vivas. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/pocillo (0,5 ml/pocillo).

### **Ejemplo 3**

#### **Determinación de los efectos de anticuerpos anti-hTLR3 sobre la producción de citocinas/quimiocinas**

Se añadieron anticuerpos purificados a CMSP a una concentración final de 20 µg/ml. Las células y los anticuerpos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos a una hora antes de la adición de 1 µg/ml de CpG2216 (sintetizado por Invitrogen) o 1 µg/ml de R848 (Invivogen). CpG2216 tiene la secuencia 5'-ggG GGA CGA TCG TCg ggg gg-3'. Las bases en letras mayúsculas están ligadas por enlaces fosfodiéster y aquellas en minúscula están ligadas por enlaces fosforotioato. R848, también conocido como resiquimod, es una imidazoquinolinamina, y está en la misma clase de compuestos que imiquimod. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 h y se congelaron a -20 °C.

Las concentraciones de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes se midieron usando tecnología Luminex. Se usó un kit Luminex de Biosource para medir las siguientes citocinas/quimiocinas: IL-β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNFα, IFNα, IFNγ, RANTES, MCP-1, MIP-1α y IP-10. En algunos casos, los niveles de IFNα se midieron usando un kit de ELISA (PBL Biomedical Labs). Se realizó análisis estadístico usando análisis de varianza bifactorial con comparaciones por emparejamiento de seguimiento.

Los resultados se muestran en la Fig. 3 e indican que la incubación de CMSP con C1130 produjo la producción de IL-8, MCP-1, MIP-1 α, RANTES y TNF-α por células humanas (n=3 experimentos). Estos efectos no se observaron en CMSP incubadas con otro anticuerpo anti-IgG1 murina de TLR3, C1068, que se generó de un modo similar a C1130. Los lotes de anticuerpo purificado se probaron para endotoxina y los niveles fueron inferiores a 1 UE/mg.

### **Ejemplo 4**

#### **Determinación de los efectos de anticuerpos anti-hTLR3 sobre la producción de IFNα**

Como se sabe que algunos TLR dimerizan y/o usan diferentes proteínas adaptoras para alterar la especificidad de unión a ligando, CMSP que se pretrataron con el anticuerpo anti-hTLR3 C1130 se estimularon con ligandos para otros TLR, en particular CpG2216 como se describe en el Ejemplo 3 para examinar el efecto de modulación de TLR3 en respuesta a otros ligandos de TLR. Como los ligandos para TLR3 y TLR9 son ácidos nucleicos, y ambos activan la secreción de interferón, se supuso que podrían compartir una ruta de señalización. Los resultados de los tres experimentos se muestran en la Fig. 4 e indican que CMSP incubadas con C1130 y CpG2216 secretaron más IFNα que las células estimuladas con CpG solo. El aumento promedio fue 7 veces.

### **Ejemplo 5**

#### **Determinación de los efectos de anticuerpos anti-hTLR3 sobre la producción de IL10**

Los ligandos para TLR7 y TLR8 también son ácidos nucleicos. R848 (resiquimod) es un ligando sintético para TLR7 y TLR8 en seres humanos, que se ha mostrado que reconoce ARN monocatenario rico en guanosina y uridina (Heil y col., Science 5663: 1526, 2004) y se usó para estimular CMSP humanas. La activación de TLR7, como TLR3, provoca la secreción de interferones tipo I. Los resultados en la Fig. 5 indican que C1130 no afectó los niveles de IFNα secretado por CMSP en respuesta a R848. Aunque las CMSP normalmente secretan niveles muy altos de IFNα en respuesta a R848, en dos de los tres experimentos la estimulación con R848 indujo la producción de ~500 pg/ml de IFNα (un nivel suficientemente bajo para ver supuestamente cualquier efecto por un mAb agonista o antagonista). C1130 afectó los niveles de IL-10 inducidos por R848. En tres experimentos, C1130 disminuyó la IL-10 producida por R848 un promedio de 5 veces.

### **Ejemplo 6**

#### **Reconocimiento de TLR3 de la superficie celular epitelial por el anticuerpo C1130**

Se realizaron análisis de citometría de flujo en un instrumento de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). El anticuerpo C1130 se conjugó con APC usando un kit de marcado de IgG1 de ratón Zenon según el protocolo del fabricante. Se incubaron cinco microlitros de reactivo de marcado por 1 µg de mAb durante 5 minutos a temperatura ambiente y se protegieron de la luz. Se añadió reactivo de bloqueo a una relación de 5 µl a 1 µg de mAb según el protocolo del fabricante. Los anticuerpo marcados con Zenon se usaron en el plazo de 30 minutos desde la conjugación. HEK293 (células epiteliales de riñón embrionario humano) que se transfectaron establemente con TLR3 humano se compraron de Invivogen.

293-TLR3 se fijaron por incubación de 15 minutos en Cytofix tanto antes de como tras la posterior tinción. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l se incubaron con anticuerpo marcado con APC en placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavaron 3 veces en PBS + 1% de SBF por centrifugación a 1600 rpm durante 2 minutos. La adquisición de datos se realizó en un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur y el análisis de datos se realizó usando WinList (Verity Software House, Topsham, ME).

Los resultados en la Fig. 6 muestran que el anticuerpo C1130 se une a TLR3 de superficie sobre células 293-hTLR3 fijadas tanto antes como después de la tinción. Se usó un anti-hTLR3 marcado con PE comercialmente disponible (clon 3.7) como control positivo e IgG1 de ratón marcada con APC Zenon como control negativo. Estos datos demuestran que el anticuerpo anti-hTLR3 C1130 reconoce células epiteliales.

### **Ejemplo 7**

#### **Reconocimiento de TLR3 de la superficie celular epitelial de pulmón por el anticuerpo C1130**

Se obtuvieron células A549, una línea celular epitelial de pulmón humano, de la Colección americana de cultivos tipo (n° de acceso de ATCC CCL-185). Las células se transfectaron con un vector de expresión de mamífero que codificaba un marcador de selección de neomicina junto con una copia de longitud completa del gen TLR3 humano bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Inc). También se transfectaron células A549 en paralelo con el ADN de plásmido de vector solo (que codifica resistencia a neomicina) como control. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se tripsinaron entonces y se sembraron a dilución de 1:20 en medio que contenía neomicina (G418) a 0,5 mg/ml. Los clones de las células aparecieron después de 2 semanas de crecimiento en medio de selección que contenía G418. Las colonias de células de cada transfección se reunieron por separado. Líneas celulares A549 derivadas de la transfección y selección con el vector de expresión de TLR3 humano de longitud completa (A549-hTLR3) o control de vector (A549-neo) se mantuvieron en medio de crecimiento que contenía 0,5 mg/ml de G418.

El anticuerpo C1130 se conjugó con APC como se describe en el Ejemplo 7. Las células A549-TLR3.2 se fijaron por incubación de 15 minutos en Cytofix tanto antes de como tras la posterior tinción. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l se incubaron con anticuerpo marcado con APC en placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavaron 3 veces en PBS + 1% de SBF por centrifugación a 1600 rpm durante 2 minutos. La adquisición de datos y el análisis se realizaron como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados en la Fig. 7 muestran que C1130 se une a TLR3 de superficie sobre células A549-TLR3.2 fijadas tanto antes como después de la tinción. Se usó un anti-hTLR3 marcado con PE comercialmente disponible (clon 3.7) como control positivo e IgG1 de ratón marcada con APC Zenon como control negativo. La capacidad de C1130 para reconocer células epiteliales de pulmón indica que tiene posible uso terapéutico en infecciones pulmonares.

### **Ejemplo 8**

#### **Reconocimiento de glóbulos blancos de cinomolgo por el anticuerpo C1130**

Sangre completa de macacos cinomolgos se diluyó 1:10 en tampón de lisis de FACS y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos. Entonces, las células se lavaron en PBS + 1% de SBF 4 veces por centrifugación a 1400 rpm durante 8 minutos. El sedimento de células resultante se resuspendió en PBS + 1% de SBF y se contó manualmente usando un hemacitómetro. La viabilidad celular se determinó tiñendo una población de células de muestra con 0,2% de azul de tripano. Todas las muestras probadas tuvieron al menos el 95% de viabilidad.

El sedimento de células total se resuspendió en 1-2 ml de PBS complementado con 10% de SBF y se mantuvo a tanto 4 °C como 37 °C para evaluar diferencias en la internalización de receptores. Se distribuyeron cincuenta microlitros (aproximadamente  $2 \times 10^6$  células) a cada pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron mAb marcados con FITC, PE y APC a 1  $\mu$ g por pocillo, se incubaron durante al menos 30 minutos a tanto 4 °C como a 37 °C y se protegieron de la luz. Entonces, las células se lavaron 3 veces en PBS + 1% de SBF por centrifugación a 1600 rpm durante 2 minutos. Después del lavado final, las células se resuspendieron en tampón Cytofix y se incubaron durante 15 minutos a tanto 4 °C como a 37 °C. Tras la fijación con paraformaldehído en el tampón Cytofix, las células se lavaron una vez por centrifugación a 1600 rpm durante 2 minutos y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS + 1% de SBF. Las muestras o bien se leyeron inmediatamente o bien se guardaron durante la noche a 4 °C antes de la adquisición. La adquisición de datos y el análisis se realizaron como se describe en el Ejemplo 7.

Los resultados mostrados en la Fig. 8 indican que C1130 se une a células positivas CD11b (cino), células positivas para CD83, células positivas para CD86 y células positivas para CD3 de macaco cinomolgo. CD83 se encuentra sobre linfocitos B y células dendríticas y CD3 se encuentra solo sobre linfocitos T, que indica que C1130 reconoce diferentes poblaciones de células en CMSP.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> CENTOCOR, INC.
- 5 <120> MODULADORES DE RECEPTOR TIPO TOLL 3, PROCEDIMIENTOS Y USOS
- <130> CEN5116 PCT
- <140> PARA SER ASIGNADO
- 10 <141> 2006-10-27
- <150> 60/730,793
- <151> 2005-10-27
- 15 <160> 24
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 2712
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 435 775 T3

	atgagacaga	ctttgccttg	tatctacttt	tggggggggcc	ttttgccctt	tgggatgctg	60
	tgtgcatcct	ccaccaccaa	gtgcaactgt	agccatgaag	ttgctgactg	cagccacctg	120
	aagttgactc	aggtaccoga	tgatctacce	acaaacataa	cagtgttgaa	cettaccat	180
5	aatcaactca	gaagattacc	agccgccaac	ttcacaaggt	atagccagct	aactagcttg	240
	gatgtaggat	ttaacaccat	ctcaaaactg	gagccagaat	tgtgccagaa	acttcccatg	300
	ttaaaagttt	tgaacctcca	gcacaatgag	ctatctcaac	tttctgataa	aacctttgcc	360
	ttctgcacga	atgtgactga	actccatctc	atgtccaact	caatccagaa	aattaaaaat	420
10	aatccctttg	tcaagcagaa	gaatttaatc	acattagatc	tgtctcataa	tggcttgtca	480
	tctacaaaaat	taggaactca	ggttcagctg	gaaaatctcc	aagagcttct	attatcaaac	540
	aataaaaattc	aagcgctaaa	aagtgaagaa	ctggatatct	ttgccaatc	atcttttaaa	600
	aaattagagt	tgtcatcgaa	tcaaattaaa	gagttttctc	caggggtgtt	tcacgcaatt	660
	ggaagattat	ttggcctctt	tctgaacaat	gtccagctgg	gtcccagcct	taagagagaag	720
15	ctatgttttg	aattagcaaa	cacaagcatt	cggaatctgt	ctctgagtaa	cagccagctg	780
	tccaccacca	gcaatacaac	tttcttggga	ctaaagtgga	caaatctcac	tatgctcgat	840
	ctttcctaca	acaacttaaa	tgtggttggg	aacgattcct	ttgcttggct	tccacaacta	900
	gaatatttct	tcttagagta	taataatata	cagcatttgt	tttctcactc	tttgcacggg	960
20	cttttcaatg	tgaggtacct	gaatttgaaa	cggctcttta	ctaaacaaag	tatttccctt	1020
	gcctcactcc	ccaagattga	tgatttttct	tttcagtggc	taaaatgttt	ggagcacctt	1080
	aacatggaag	ataatgatat	tccaggcata	aaaagcaata	tgttcacagg	attgataaac	1140
	ctgaaatact	taagtctatc	caactccttt	acaagtttgc	gaactttgac	aaatgaaca	1200
	tttgtatcac	ttgctcattc	tcccttacac	atactcaacc	taaccaagaa	taaaatctca	1260
25	aaaatagaga	gtgatgcttt	ctcttgggtg	ggccacctag	aagtacttga	cctgggcctt	1320
	aatgaaattg	ggcaagaact	cacaggccag	gaatggagag	gtctagaaaa	tattttcgaa	1380
	atctatcttt	cctacaacia	gtacctgcag	ctgactagga	actcctttgc	cttgggtcca	1440
	agccttcaac	gactgatgct	ccgaagggtg	gcccttaaaa	atgtggatag	ctctccttca	1500
30	ccattccagc	ctcttcgtaa	cttgaccatt	ctggatctaa	gcaacaacia	catagccaac	1560
	ataaatgatg	acatgttgga	gggtcttgag	aaactagaaa	ttctcgattt	gcagcataac	1620
	aacttagcac	ggctctggaa	acacgcaaac	cctgggtggc	ccatttattt	cctaaagggg	1680
	ctgtctcacc	tccacatcct	taacttggag	tccaacggct	ttgacgagat	cccagttgag	1740
	gtcttcaagg	atltatttga	actaaagatc	atcgatttag	gattgaataa	tttaaacaca	1800
35	cttccagcat	ctgtctttaa	taatcagggtg	tctctaaagt	cattgaacct	tcagaagaat	1860
	ctcataacat	ccgttgagaa	gaagggtttc	gggccagctt	tcaggaacct	gactgagtta	1920
	gatatgcgct	ttaatccctt	tgattgcacg	tgtgaaagta	ttgcttgggt	tgtttaattgg	1980
	attaacgaga	cccataccaa	catccctgag	ctgtcaagcc	actacctttg	caacactcca	2040
	cctcactatc	atggggtccc	agtgagactt	tttgatacat	catcttgcaa	agacagtgcc	2100
40	ccctttgaac	tctttttcat	gatcaatacc	agtatcctgt	tgatttttat	ctttattgta	2160
	cttctcatcc	actttgaggg	ctggaggata	tctttttatt	ggaatgtttc	agtacatoga	2220
	gttcttgggt	tcaaagaaat	agacagacag	acagaacagt	ttgaatatgc	agcatatata	2280
	attcatgcct	ataaagataa	ggattgggtc	tgggaacatt	tctcttcaat	ggaaaaggaa	2340
45	gaccaatctc	tcaaattttg	tctggaagaa	agggactttg	aggcgggtgt	ttttgaaacta	2400
	gaagcaattg	ttaacagcat	caaaagaagc	agaaaaatta	tttttgttat	aacacaccat	2460
	ctattaaaag	accatttatg	caaaagattc	aaggtacatc	atgcagttca	acaagctatt	2520
	gaacaaaatc	tggattccat	tatattgggt	ttccttgagg	agattccaga	ttataaactg	2580
	aaccatgcac	tctgtttgcg	aagaggaatg	tttaaactct	actgcatctt	gaactggcca	2640
50	gttcagaaag	aacggatagg	tgcccttctg	cataaattgc	aagtagcact	tggatccaaa	2700
	aactctgtac	at					2712

<210> 2  
 <211> 904  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

60

65

ES 2 435 775 T3

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 435 775 T3

Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser  
 245 250 255  
 5 Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys  
 260 265 270  
 Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val  
 275 280 285  
 10 Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe  
 290 295 300  
 Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly  
 305 310 315 320  
 15 Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln  
 325 330 335  
 Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln  
 340 345 350  
 20 Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro  
 355 360 365  
 Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu  
 370 375 380  
 Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr  
 385 390 395 400  
 25 Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys  
 405 410 415  
 Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His  
 420 425 430  
 30 Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr  
 435 440 445  
 Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser  
 450 455 460  
 35 Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp  
 485 490 495  
 Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp  
 500 505 510  
 40 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly  
 515 520 525  
 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg  
 530 535 540  
 45 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly  
 545 550 555 560  
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu  
 565 570 575  
 50 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp  
 580 585 590  
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn  
 595 600 605  
 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser  
 610 615 620  
 55 Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu  
 625 630 635 640  
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp  
 645 650 655  
 60  
 65

ES 2 435 775 T3

	Phe	Val	Asn	Trp	Ile	Asn	Glu	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Glu	Leu	Ser
				660					665					670		
	Ser	His	Tyr	Leu	Cys	Asn	Thr	Pro	Pro	His	Tyr	His	Gly	Phe	Pro	Val
			675					680					685			
5	Arg	Leu	Phe	Asp	Thr	Ser	Ser	Cys	Lys	Asp	Ser	Ala	Pro	Phe	Glu	Leu
		690					695					700				
	Phe	Phe	Met	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Val
	705					710					715					720
10	Leu	Leu	Ile	His	Phe	Glu	Gly	Trp	Arg	Ile	Ser	Phe	Tyr	Trp	Asn	Val
				725						730					735	
	Ser	Val	His	Arg	Val	Leu	Gly	Phe	Lys	Glu	Ile	Asp	Arg	Gln	Thr	Glu
			740						745					750		
15	Gln	Phe	Glu	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Ile	His	Ala	Tyr	Lys	Asp	Lys	Asp	
		755						760					765			
	Trp	Val	Trp	Glu	His	Phe	Ser	Ser	Met	Glu	Lys	Glu	Asp	Gln	Ser	Leu
		770						775					780			
20	Lys	Phe	Cys	Leu	Glu	Glu	Arg	Asp	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Phe	Glu	Leu
	785					790						795				800
	Glu	Ala	Ile	Val	Asn	Ser	Ile	Lys	Arg	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Phe	Val
					805						810				815	
	Ile	Thr	His	His	Leu	Leu	Lys	Asp	Pro	Leu	Cys	Lys	Arg	Phe	Lys	Val
				820					825					830		
25	His	His	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Ile	Glu	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Ile	Ile
			835						840					845		
	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Tyr	Lys	Leu	Asn	His	Ala	Leu
		850					855						860			
30	Cys	Leu	Arg	Arg	Gly	Met	Phe	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Leu	Asn	Trp	Pro
	865					870						875				880
	Val	Gln	Lys	Glu	Arg	Ile	Gly	Ala	Phe	Arg	His	Lys	Leu	Gln	Val	Ala
					885					890					895	
35	Leu	Gly	Ser	Lys	Asn	Ser	Val	His								
				900												

<210> 4  
 <211> 703  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

45	atgagacaga	ctttgccttg	tatctacttt	tgggggggccc	ttttgcccctt	tgggatgctg	60
	tgtgcatcct	ccaccaccaa	gtgcactggt	agccatgaag	ttgctgactg	cagccacctg	120
	aagttgactc	aggtaccocga	tgatctaccc	acaaacataa	cagtgttgaa	ccttaccat	180
	aatcaactca	gaagattacc	agccgccaac	ttcacaaggt	atagccagct	aactagcttg	240
	gatgtaggat	ttaacaccat	ctcaaaaactg	gagccagaat	tgtgccagaa	acttcccctg	300
50	ttaaaagttt	tgaacctcca	gcacaatgag	ctatctcaac	tttctgataa	aacctttgcc	360
	ttctgcacga	atgtgactga	actccatctc	atgtccaact	caatccagaa	aattaaaaat	420
	aatccctttg	tcaagcagaa	gaatttaatc	acattagatc	tgtctcataa	tggcttgca	480
	tctacaaaat	taggaactca	ggttcagctg	gaaaatctcc	aagagcttct	attatcaaac	540
	aataaaattc	aagcgctaaa	aagtgaagaa	ctggatatct	ttgccaattc	atctttaaaa	600
55	aaattagagt	tgtcatcgaa	tcaaattaaa	gagttttctc	caggggtggtt	tcacgcaatt	660
	ggaagattat	ttggcctctt	tctgaacaat	gtccagctgg	gtcccagcct	tacagagaag	720
	ctatgtttgg	aattagcaaa	cacaagcatt	cggaatctgt	ctctgagtaa	cagccagctg	780
	tccaccacca	gcaatacaac	tttcttggga	ctaaagtgga	caaatctcac	tatgctcgat	840

60

65

ES 2 435 775 T3

Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln  
 195 200 205  
 5 Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe  
 210 215 220  
 Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser  
 245 250 255  
 10 Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys  
 260 265 270  
 Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val  
 275 280 285  
 15 Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe  
 290 295 300  
 Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly  
 305 310 315 320  
 20 Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln  
 325 330 335  
 Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln  
 340 345 350  
 25 Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro  
 355 360 365  
 Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu  
 370 375 380  
 30 Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr  
 385 390 395 400  
 Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys  
 405 410 415  
 Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His  
 420 425 430  
 35 Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr  
 435 440 445  
 Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser  
 450 455 460  
 40 Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp  
 485 490 495  
 45 Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp  
 500 505 510  
 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly  
 515 520 525  
 50 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg  
 530 535 540  
 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly  
 545 550 555 560  
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu  
 565 570 575  
 55 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp  
 580 585 590  
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn  
 595 600 605  
 60 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser  
 610 615 620

65



ES 2 435 775 T3

Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu  
 625 630 635 640  
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp  
 645 650 655  
 5 Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser  
 660 665 670  
 Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val  
 675 680 685  
 10 Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu  
 690 695 700

<210> 5  
 <211> 399  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 5

20 atggaatgta actggatact tccttttatt ctgtcggtaa tttcaggggt ctactcagag 60  
 gttcagctcc agcagtctgg gactgtgctg gcaaggcctg gggcttccgt gaagatgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggctacag gttttccagc tacgggatgc actgggtaaa acagaggcct 180  
 ggacagggtc tagaatggat tgggtctatt tatectggaa acaatgatat tacttatact 240  
 25 cagaagttca agggcaaggc caaactgact gcagtcacat ccgccagcac tacctacatg 300  
 gaactcagca gcctgacaaa tgaagactct gcggtctatt actggttcaac tctaattgtt 360  
 gcttattggg gcccaaggac tctggtcact gtcactgca 399

<210> 6  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

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

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 7

65

ES 2 435 775 T3

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Val Tyr Ser  
 5  
 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <400> 8  
 15 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
 20 25  
 20  
 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <400> 9  
 30 Gly Tyr Arg Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
 1 5 10  
 <210> 10  
 <211> 14  
 35 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 10  
 40 Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10  
 45 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 50 <400> 11  
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Asn Asp Ile Thr Tyr Thr Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 55 Gly  
 <210> 12  
 <211> 32  
 60 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 12  
 65

ES 2 435 775 T3

```

    Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Thr Tyr Met Glu
      1           5           10           15
    Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr
      20           25           30
5
<210> 13
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Mus musculus

<400> 13

                Leu Met Phe Ala Tyr
15                1           5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Mus musculus

<400> 14

                Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ala
25                1           5           10

<210> 15
<211> 387
30 <212> DNA
    <213> Mus musculus

<400> 15
35   atggacatga gggttcctgc tcacgttttt ggcttcttgt tgctctggtt tccaggtacc 60
    agatgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tcttccttat ctgcctctct gggagaaaga 120
    gtcagttctca ctgtgcgggc aagtcaggaa attagtgatc acttaagttg gcttcagcag 180
    aaatcgggtg gaactattaa acgcctggtc tatgcccgat ccactttaga ttctgggtgc 240
40   ccaaaaaggt tcagtggcag taggtctggg tcagactttt ctctcaccat cagcagcctt 300
    gagtctgaag attttgcaga ctattactgt ctacgatatg ataattatcc gtggacgttc 360
    ggtgcaggca ccaggctgga aatcaga                                387

<210> 16
45 <211> 129
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

<400> 16
50   Met Asp Met Arg Val Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp
      1           5           10           15

55

60

65

```

ES 2 435 775 T3

```

Phe Pro Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      20      25      30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser
      35      40      45
5  Gln Glu Ile Ser Asp His Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Ser Gly Gly
      50      55      60
Thr Ile Lys Arg Leu Val Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val
      65      70      75      80
10 Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Phe Ser Leu Thr
      85      90      95
Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Arg
      100      105      110
15 Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile
      115      120      125
Arg

```

```

20 <210> 17
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

```

25 <400> 17
    Met Asp Met Arg Val Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp
      1      5      10      15
    Phe Pro Gly Thr Arg Cys
      20

```

```

30 <210> 18
    <211> 23
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

```

35 <400> 18
    Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
      1      5      10      15
    Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys
      20

```

```

45 <210> 19
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

```

50 <400> 19
      Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Asp His Leu Ser
        1      5      10

```

```

55 <210> 20
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

```

60 <400> 20

```

```

65

```

ES 2 435 775 T3

Trp Leu Gln Gln Lys Ser Gly Gly Thr Ile Lys Arg Leu Val Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 21

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser  
 1 5

15 <210> 22  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20 <400> 22

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

30 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 23

Leu Arg Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Thr  
 1 5

40 <210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

45 <400> 24

Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg  
 1 5 10

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado reactivo con hTLR3:
- 5 que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada como se muestran en SEC ID N°: 9, 11 y 13 y las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera como se muestran en SEC ID N°: 19, 21 y 23; o  
que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6 y una  
cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16.
- 10 2. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 1.
3. Un polinucleótido aislado que codifica:
- 15 una cadena pesada del anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°: 9, 11 y 13;  
una cadena ligera del anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en SEC ID N°:  
19, 21 y 23;  
20 una cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 6. o  
una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16.
4. El polinucleótido de la reivindicación 3 que comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 5.
- 25 5. El polinucleótido de la reivindicación 3 que comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 15.
6. Un vector que comprende al menos un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 5.
7. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 ó 5.
- 30 8. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo reactivo con hTLR3 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

**Secuencia nucleotida para la región variable de la cadena pesada C1130**

ATGGAATGTAACGGATACTTCCTTTTATCTGTCGGTAATTTTCAGGGGTCTACTCAGAGGTC  
AGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTACAGGTTTTCCAGCTACGGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTA  
GAAATGGATTGGTGCTATTTATCCTGGAAACAATGATATTACTTATACTCAGAAGTCAAGGGCA  
AGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTACCTACATGGAACTCAGCAGCCTGACAAA  
TGAAGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAACTCTAATGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTG  
GTCCTGTCACTGCA (SEQ ID NO: 5)

**Secuencia aminoácida para la región variable de la cadena pesada C1130**

MECNWILPFILSVISGVYSEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFSYGMHWVKQRPGQGL  
EWIGAIYPGNNDITYTQKFKGKAKLTAVTSASTTYMELSSLTNEDESAVYYCSTLMFAYWGQGL  
VTVTA (SEQ ID NO: 6)

**Secuencia Señal**

MECNWILPFILSVISGVYS (SEQ ID NO: 7)

**FR1**

EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 8)

**CDR1**

GYRFSYGMH (SEQ ID NO: 9)

**FR2**

WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 10)

**CDR2**

AIYPGNNDITYTQKFKG (SEQ ID NO: 11)

**FR3**

KAKLTAVTSASTTYMELSSLTNEDESAVYYCST (SEQ ID NO: 12)

**CDR3**

LMFAY (SEQ ID NO: 13)

**Raton J HC**

WGQGLVTVTA (SEQ ID NO: 14)

FIGURA 2

Secuencia nucleotida para la región variable de la cadena ligera C1130

ATGGACATGAGGGTTCCTGCTCACGTTTTTGGCTTCTTGTGCTCTGGTTCCAGGTACCAGAT  
GTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCT  
CACTTGTCGGGCAAGTCAGGAAATTAGTGATCACTTAAGTTGGCTTCAGCAGAAATCGGGTGGA  
ACTATTAACGCCTGGTCTATGCCGCATCCACTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTTTCAGTG  
GCAGTAGGTCTGGGTCAGACTTTTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTGCAGA  
CTATTACTGTCTACGATATGATAATTATCCGTGGACGTTTCGGTGCAGGCACCAGGCTGGAAATC  
AGA (SEQ ID NO: 15)

Secuencia aminoácida para la región variable de la cadena ligera C1130

MDMRVPAHVFGFLLLWFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISDHLSWLQKSGG  
TIKRLVYAASLDGSGVPKRFSGRSGDFSLTISSESEDFADYYCLRYDNPWTFGAGTRLEI  
R (SEQ ID NO: 16)

Secuencia señal

MDMRVPAHVFGFLLLWFPGTRC (SEQ ID NO: 17)

FR1

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC (SEQ ID NO: 18)

CDR1

RASQEISDHLS (SEQ ID NO: 19)

FR2

WLQKSGGTIKRLVY (SEQ ID NO: 20)

CDR2

AASTLDS (SEQ ID NO: 21)

FR3

GVPKRFSGRSGDFSLTISSESEDFADYYC (SEQ ID NO: 22)

CDR3

LRYDNPWT (SEQ ID NO: 23)

Ratón J KAPPA

FGAGTRLEIR (SEQ ID NO: 24)



FIGURA 3

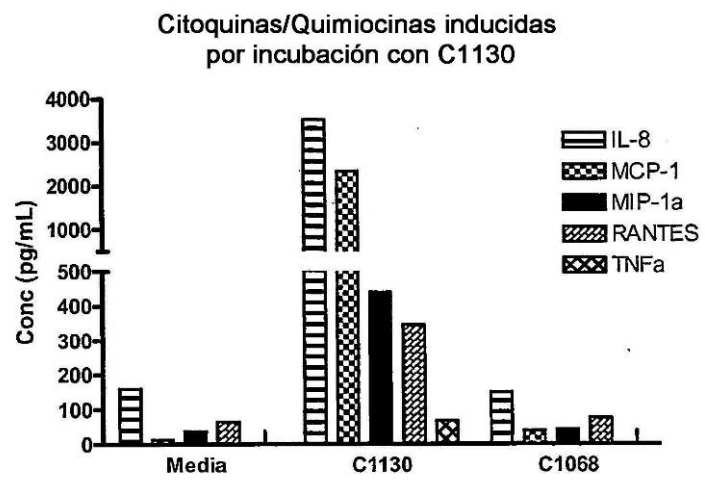


FIGURA 4

Producción de IFN $\alpha$  en 24h

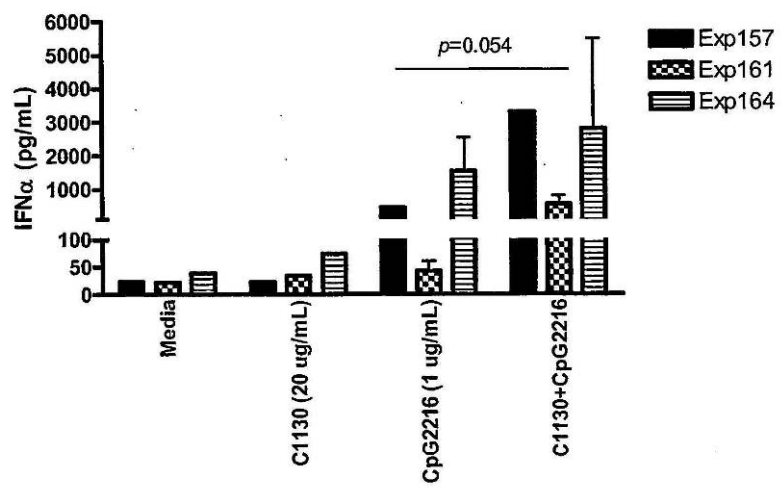


FIGURA 5

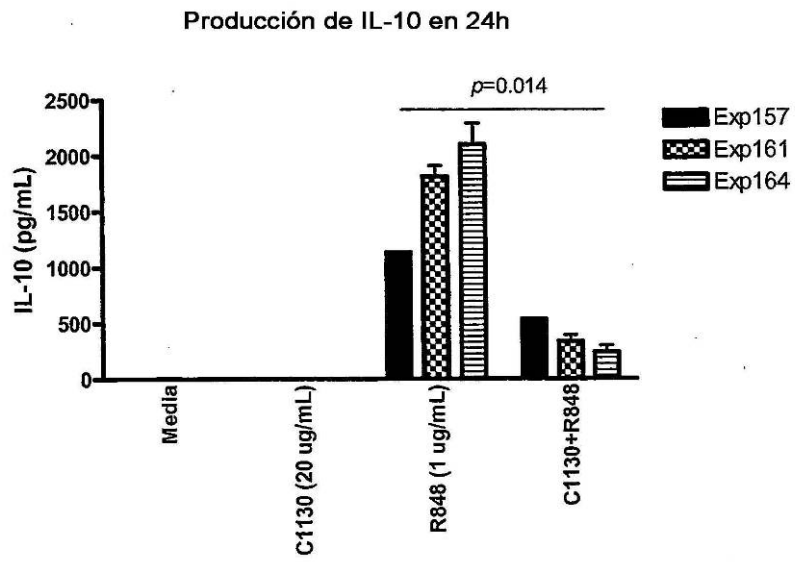


FIGURA 6

293-TLR3

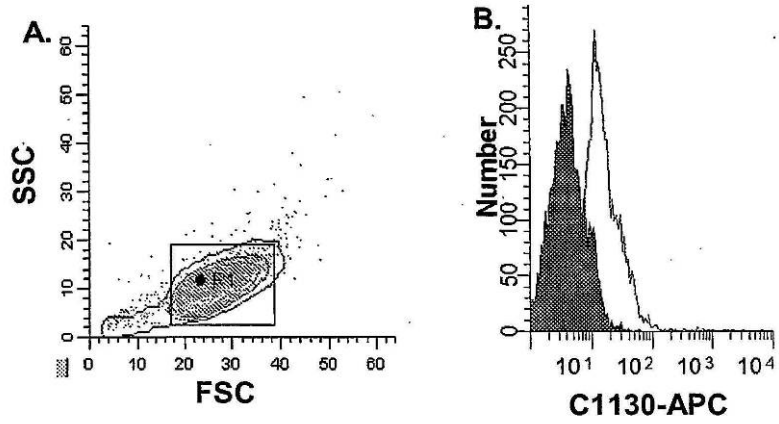


FIGURA 7

**A549-TLR3.2**

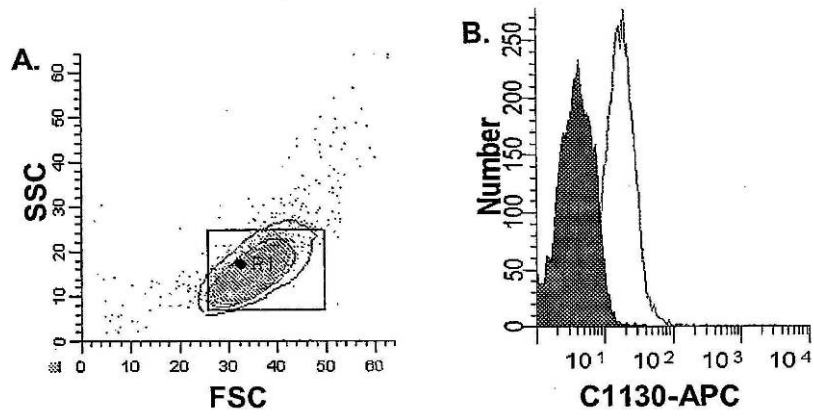


FIGURA 8

