

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 615**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10728262 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2451842**

54 Título: **Anticuerpos humanizados contra receptores de tipo Toll 2 y sus usos**

30 Prioridad:

06.07.2009 IE 20090514
06.07.2009 US 270239 P

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

28.08.2014

73 Titular/es:

OPSONA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Second Floor, Ashford House, Tara Street
Dublin 2, IE

72 Inventor/es:

DELLACASAGRANDE, JEROME

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 488 615 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 humanizados contra receptores de tipo Toll 2 y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos totalmente humanizados y sus fragmentos y, en particular, a anticuerpos totalmente humanizados que presentan especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 (TLR2, TLR-2). La invención también se refiere al uso de dichos anticuerpos totalmente humanizados para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por la activación y la señalización del receptor de tipo Toll 2.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores de tipo Toll (TLR) forman una familia de receptores de reconocimiento de patrones que desempeñan un papel clave en la modulación de la respuesta inmunológica innata, y también están implicados en la reparación de tejidos, el mantenimiento de la integridad de los tejidos y la tumorigénesis. Hasta la fecha se han identificado once receptores de tipo Toll en seres humanos. Los miembros de la familia del receptor de tipo Toll están muy conservados, y la mayoría de las especies de mamífero tienen entre 10 y 15 receptores de tipo Toll. Cada receptor
15 de tipo Toll reconoce firmas moleculares asociadas a patógenos específicas. El receptor de tipo Toll 2 (TLR2, CD282, TLR-2) puede ser activado por peptidoglicanos, lipoproteínas, ácido lipoteicoico y ligandos endógenos.

Se conocen una serie anticuerpos monoclonales que tienen especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2. El documento WO 01/36488 describe un anticuerpo, denominado TL2.1, que se deriva de una línea celular de hibridoma depositada según el tratado de Budapest en the European Collection of Cell Cultures (ECACC) con el número de registro 99102832. Este anticuerpo antagoniza la activación del receptor de tipo Toll 2 expresado en
20 células humanas.

El documento WO 2005/028509 describe un anticuerpo monoclonal murino, denominado T2.5, que inhibe específicamente la activación del TLR2 humano. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal T2.5 presenta reacción cruzada con las formas humana y murina de TLR2. Este documento también contiene datos experimentales que sugieren que el anticuerpo monoclonal anti-TLR2 TL2.1 murino, tal como se describe en el documento WO 01/36488, no presenta reacción cruzada con las formas humana y murina de TLR2, tal como se indica en la memoria descriptiva de esta solicitud de patente. Por el contrario, en el documento WO 2005/028509, se demuestra que el anticuerpo TL2.1 solo se une al receptor de tipo Toll 2 humano y no al receptor de tipo Toll 2 murino. El anticuerpo monoclonal T2.5 del documento WO 2005/028509 se generó contra el dominio extracelular de
25 TLR2 y, por tanto, presenta especificidad de unión con un epitopo en el área del receptor de tipo Toll 2.

El documento WO 2005/019431 describe un anticuerpo que presenta especificidad de unión al TLR2, que se denomina 11G7. Este anticuerpo murino puede obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma 11G7, depositada en the American Type Culture Centre (ATCC) con la denominación PTA-5014. El anticuerpo monoclonal 11G7 se une selectivamente al dominio extracelular de TLR2 y puede bloquear la inducción de la producción de citoquinas por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con un agonista que activa un heterodímero formado entre el receptor de tipo Toll 1 (TLR1) y TLR2. El anticuerpo 11G7 no inhibe la producción de citoquinas por PBMC estimuladas con un agonista que induce la señalización a través de un heterodímero formado entre el receptor de tipo Toll 6 (TLR6) y TLR2.
30

El uso de anticuerpos monoclonales de roedor, tales como anticuerpos monoclonales murinos, para aplicaciones terapéuticas *in vivo*, ha demostrado estar asociado con la generación de respuestas inmunológicas no deseadas, que son generadas por el sujeta al cual se administra el anticuerpo. Estas respuestas inmunológicas pueden provocar la producción de anticuerpos que neutralicen, de modo eficaz, la eficacia del anticuerpo terapéutico. Estas respuestas inmunológicas generalmente se denominan respuestas de anticuerpos antiratón humanos (HAMA). Las respuestas HAMA comprometen la eficacia terapéutica del anticuerpo administrado a través de una serie de vías, que incluyen alterar la capacidad del anticuerpo terapéutico para alcanzar su diana de unión, comprometiéndose así el efecto terapéutico del anticuerpo.
35

Se han desarrollado una serie de estrategias para solucionar la cuestión de las respuestas HAMA no deseadas que se generan contra anticuerpos terapéuticos que se administran a individuos. Generalmente, estas estrategias implican técnicas que dan como resultado la sustitución de ciertos componentes del anticuerpo de ratón por porciones equivalentes derivadas de un anticuerpo humano. Estas estrategias pueden originar, por ejemplo, la producción de anticuerpos quiméricos que comprenden regiones variables murinas unidas a regiones constantes derivadas de seres humanos. Como alternativa, puede emplearse una técnica conocida como "injerto de CDR", en la que regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de un anticuerpo murino se injertan en un marco proporcionado por regiones de dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos humanos. Esto da como resultado la producción de un anticuerpo que conserva la especificidad de unión del anticuerpo murino, pero en el que los únicos componentes no humanos son las regiones CDR murinas injertadas.
40
45
50
55

Sin embargo, en ambas estrategias, la eficacia terapéutica del anticuerpo humanizado resultante puede verse alterada. Por ejemplo, el componente de la región variable murina de un anticuerpo quimérico todavía puede proporcionar la base para que una respuesta HAMA se genere con él. Además, cuando se han producido anticuerpos humanizados con injertos de CDR, se ha observado que el simple trasplante de las regiones CDR a menudo da como resultado una eficacia terapéutica reducida del anticuerpo debido a que la afinidad de unión del anticuerpo disminuye.

Por tanto, el inventor ha identificado la necesidad de generar anticuerpos monoclonales totalmente humanizados que tengan especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2, y que antagonicen la función de TLR2, pero que sean fundamentalmente no inmunogénicos en seres humanos. Después de una intensiva labor de experimentación, el inventor ha producido un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado que tiene especificidad de unión con el receptor de tipo Toll 2 humano y que antagoniza la función de TLR2, independientemente de si el receptor de tipo Toll 2 forma un heterodímero con el receptor de tipo Toll 1 o el receptor de tipo Toll 6. Este anticuerpo antagonista de TLR2 no se produce mediante técnicas de injerto de CDR o quiméricas previamente conocidas y, por tanto, no contiene restos aminoácidos murinos. Además, se demuestra que el anticuerpo media en la neutralización de TLR2 sin necesidad de unirse al antígeno de la superficie celular CD32, siendo este un requisito funcional de otros anticuerpos antagonistas del receptor de tipo Toll 2 conocidos. Además, el anticuerpo totalmente humanizado de la invención es el primer anticuerpo neutralizante de TLR2 totalmente humano que se conoce en la técnica. El anticuerpo no muestra epitopos de células T y, por tanto, no se generan anticuerpos neutralizantes contra él cuando se administra a un sujeto. Los anticuerpos antagonistas anti-TLR2 también muestran un amplio nivel de reactividad cruzada con el receptor de tipo Toll 2, según es expresado por una amplia gama de células de mamífero, habiéndose observado, de modo sorprendente, que el anticuerpo totalmente humanizado se une al receptor de tipo Toll 2 expresado en células de mono, ratón y humanas.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo neutralizante, o una de sus porciones de unión al antígeno, que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:1, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:1, y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:4, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, en el que el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une específicamente con el dominio extracelular del receptor de tipo Toll 2 (TLR2, CD282, TLR-2) y antagoniza la función del receptor de tipo Toll 2, en el que dicho antagonismo es mediado independientemente de la unión del anticuerpo, o de una de sus porciones de unión al antígeno, a CD32.

Tal como se define en la presente, la expresión anticuerpo neutralizante describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la señalización y la activación biológica del receptor de tipo Toll 2. El anticuerpo neutralizante, que también puede denominarse un anticuerpo antagonista o un anticuerpo de bloqueo, de modo específico y preferiblemente de modo selectivo se une al receptor de tipo Toll 2 e inhibe una o más actividades biológicas del receptor de tipo Toll 2. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede inhibir la unión de un ligando o sustrato, tal como un ligando del receptor de tipo Toll 2, al sitio de unión al ligando del receptor de tipo Toll 2. Como alternativa, el anticuerpo neutralizante puede evitar la activación del receptor de tipo Toll 2 una vez unido por un agonista de ligando, por ejemplo, alterando la unión del agonista ligando. Generalmente, el anticuerpo neutralizante se une selectivamente al receptor de tipo Toll 2 y, por tanto, no se une sustancialmente a otros miembros de la familia de receptores de tipo Toll (por ejemplo, receptor de tipo Toll 4) bajo condiciones fisiológicas o terapéuticas.

El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 media en el antagonismo de la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2 independientemente del requisito del anticuerpo anti-receptor de tipo Toll 2, o un fragmento de unión, de unirse a CD32 (receptor Fc gamma II, FcγRII, FcγRII), en particular CD32a y/o CD32b. Por consiguiente, la neutralización del receptor de tipo Toll 2 no requiere la unión del anticuerpo, y en particular, de la porción Fc del anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, a CD32.

Generalmente, los anticuerpos anti-receptor de tipo Toll 2 de la invención se caracterizan por que no contienen epitopos de unión contra los cuales puede generarse una respuesta inmunológica cuando el anticuerpo se administra a un sujeto, en particular a un ser humano. Esta característica es importante para prevenir la generación de anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos de la invención en el sujeto al cual se administran los anticuerpos, puesto que la eficacia terapéutica de los anticuerpos puede verse gravemente alterada si se produjese dicha respuesta inmunológica.

Generalmente, el anticuerpo neutralizante anti-receptor de tipo Toll 2 es un anticuerpo totalmente humanizado. Es decir, todas las combinaciones de restos aminoácidos que comprende el anticuerpo tienen un origen enteramente humano y, por tanto, no contienen, por ejemplo, regiones humanas y no humanas. En particular, el anticuerpo de la invención comprende solo secuencias de la región variable humanas. El anticuerpo de la invención, por tanto, se diferencia, por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal quimérico, formado por restos aminoácidos derivados de ratones y seres humanos en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, o de un anticuerpo "humanizado" con injerto de CDR, en el que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de regiones variables de

5 las cadenas pesada y ligera comprenden restos aminoácidos derivados de un anticuerpo murino, mientras que las regiones de marco (FR) asociadas del anticuerpo y las regiones constantes (CR) se derivan de un anticuerpo humano. Por tanto, el anticuerpo totalmente humanizado de la invención tiene regiones variables y constantes, de cadenas pesadas y ligeras, que son todas de origen humano, o que son sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, aunque no necesariamente del mismo anticuerpo. Los anticuerpos totalmente humanizados de la invención también pueden denominarse anticuerpos "humanizados" o un anticuerpo derivado totalmente de secuencias humanas.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo de la invención se muestra a continuación como SEQ ID NO:1:

10 **DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFGASNVES
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGMVFCQQSRKLPWTFGGGTKVEIK**

15 En SEQ ID NO:1, tal como se muestra en la figura 1, los restos subrayados se refieren a la localización de las regiones determinantes de la complementariedad, mientras que los restos 24 a 34 se refieren a CDR1, los restos 50 a 56 se refieren a CDR2, y los restos 89 a 97 se refieren a CDR3. La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y la secuencia de aminoácidos deducida. En esta figura, los restos del dominio de cadena ligera se numeran, de modo convencional, según el sistema de numeración de Kabat (Kabat E.A. *et al.* (1991), *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª edición, Bethesda, US Department of Health and Human Services).

20 Debe advertirse que la identificación de estos restos de CDR es coherente con los restos asignados a las regiones CDR empleando el sistema de numeración de Kabat, en el que VLCDR1 (es decir, la región determinante de la complementariedad 1 del dominio variable de cadena ligera) comprende los restos 24 a 34, VLCDR2 (la región determinante de la complementariedad 2 del dominio variable de cadena ligera) comprende los restos 50 a 56, y VLCDR3 (la región determinante de la complementariedad 3 del dominio variable de cadena ligera) comprende los restos 89 a 97.

25 Tal como se define en la presente, una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 significa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente 95% de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia a lo largo de una longitud de al menos 20, 50 o 100 aminoácidos, o de la longitud completa de la secuencia, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Generalmente, estas secuencias de aminoácidos homólogas tendrán una especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 y, cuando se unen al receptor de tipo Toll 2, antagonizarán la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2.

30 Generalmente, la región variable de la cadena ligera (VL) se une a un dominio constante kappa de inmunoglobulina humana (CL) para proporcionar una cadena ligera, siendo dicha cadena ligera la cadena ligera del anticuerpo humanizado.

35 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, cuando el anticuerpo o el miembro de unión de la invención comprende una cadena ligera completa, la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2:

**DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFGA
SNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGMVFCQQSRKLPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C**

40 En ciertas otras realizaciones, la invención se extiende a un anticuerpo o un miembro de unión que comprende una cadena ligera que comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Generalmente, el anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o más de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:2 se unirá específicamente al receptor de tipo Toll 2 y, cuando esté unido a este, actuará para antagonizar la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2.

45 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, según se define en SEQ ID NO:2 y se

muestra en la figura 3, se codifica a partir de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, según se muestra en la figura 4. En la secuencia de SEQ ID NO:3 mostrada en la figura 4, los ácidos nucleicos subrayados codifican los aminoácidos de la región variable de cadena ligera.

5 En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) se muestra a continuación como SEQ ID NO:4:

**QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWWRQAPGGGLEWIGWIYPR
DGSTNFNENFKDRATITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCARLTGGTFLDYW
GQGTTVTVSS**

10 En SEQ ID NO:4, tal como se muestra en la figura 2, los restos subrayados se refieren a los restos aminoácidos de las 3 regiones determinantes de la complementariedad, en los que los restos 31 a 35 se refieren a CDR1 (VHCDR1, región determinante de la complementariedad 1 del dominio variable de cadena pesada), los restos 50 a 65 se refieren a CDR2 (VHCDR2), y los restos 95 a 103 se refieren a CDR3 (VHCDR3). Debe advertirse que la colocación de estos restos de CDR se diferencia ligeramente de la colocación generalmente atribuida a las regiones CDR utilizando el sistema de numeración de Kabat, en el que la CDR1 está presente en los restos 31 a 35, CDR2 está presente en los restos 50 a 66, y CDR3 está presente en los restos 95 a 103.

15 Según se define en la presente, una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 significa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente 95% de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 98% de identidad de aminoácidos a lo largo de una longitud de al menos 20, 50 o 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En ciertas otras realizaciones, la invención se extiende a un anticuerpo o un miembro de unión que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende, consiste, o consiste
20 fundamentalmente en una homología de secuencia de aminoácidos de al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

25 Generalmente, la región variable de la cadena pesada (VH) se une a otra secuencia de aminoácidos que comprende al menos un dominio constante de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, el dominio constante de inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo de la subclase IgG (inmunoglobulina G) para formar la cadena pesada completa del anticuerpo humanizado de la invención. Por consiguiente, dicho dominio constante puede comprender CH1, CH2 y CH3 junto con un conector adecuado localizado entre dichos dominios CH1 y CH2.

30 En ciertas realizaciones, los dominios constantes de inmunoglobulinas se derivan de una inmunoglobulina del isotipo IgG, generalmente una inmunoglobulina G, isotipo 4 (IgG4). Los anticuerpos IgG4 son moléculas dinámicas que intercambian los brazos Fab cambiando una cadena pesada y una cadena ligera unida (media molécula) por una pareja de cadenas pesada-ligera de otra molécula, dando este intercambio como resultado la producción de anticuerpos biespecíficos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se produce al menos una mutación en la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los dominios constantes de la inmunoglobulina IgG4 para evitar que se produzca el intercambio de brazos Fab. Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la invención, cuando un
35 anticuerpo o un fragmento de anticuerpo comprende dominios constantes derivados de IgG4, se realizará una mutación del resto aminoácido 241 de la cadena pesada, localizado en la región de bisagra, de modo que el resto serina se sustituye por un resto prolina (S241P) (según se indica en Angal S. *et al.*, Molecular Immunology, 1993, vol. 30, n.º 1, pp. 105-108).

40 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los restos aminoácidos utilizados para proporcionar los restos del dominio constante de cadena pesada y ligera se derivan de una inmunoglobulina de isotipo IgG4. En ciertas otras realizaciones, la inmunoglobulina se deriva de una inmunoglobulina de la subclase IgG y del isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. En ciertas otras realizaciones, los restos aminoácidos utilizados para proporcionar los restos del dominio constante de cadena pesada y ligera se derivan de una inmunoglobulina del subtipo IgA.

45 En diversas otras realizaciones, pueden producirse una o más mutaciones, sustituciones, deleciones o inserciones en la secuencia de aminoácidos del dominio constante del anticuerpo para modificar las propiedades funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, puede realizarse al menos una mutación, inserción, deleción y/o sustitución de un aminoácido en los restos aminoácidos de un dominio constante para modificar al menos una propiedad seleccionada, pero sin limitarse a las propiedades de función efectora, potencia o semivida del anticuerpo.

50 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo según la presente invención, que comprende los dominios VH-CH1-CH2-CH3 y que también incluye una región de bisagra, se proporciona a continuación como SEQ ID NO:5:

QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWVRQAPGGGLEWIGWIYPR
 DGSTNFNENFKDRATITVDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARLTGGTFLDYW
 QGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVKDRVE
 SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKLSLSLGLK

5 En ciertas otras realizaciones, la invención se extiende a un anticuerpo o un miembro de unión que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos homóloga que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente 98% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

10 En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, según se define en SEQ ID NO:5 y se muestra en la figura 5, es codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:6, tal como se muestra en la figura 6. En la secuencia de SEQ ID NO:5, tal como se muestra en la figura 5, los restos en **negrita** son la región de bisagra, los restos en *cursiva* son los restos del dominio constante CH1, los restos subrayados son los restos del dominio constante CH2, y los restos listados después de los restos subrayados son los restos del dominio constante CH3. En ciertas realizaciones, los dominios constantes CH1, CH2 y/o CH3 pueden estar sustituidos, en su totalidad o en parte, por un dominio CH1, CH2 o CH3 derivado de cualquier subtipo de inmunoglobulina adecuado, tal como, pero sin limitarse a IgG1, IgG2, IgA o IgM. En ciertas realizaciones, también puede proporcionarse la **delección**, la **adición** o la **sustitución** de al menos un resto aminoácido presente en cualquiera de los dominios constantes. Generalmente, dichas **delecciones**, **adiciones** o **sustituciones** provocan un cambio funcional en las propiedades de unión de la porción Fc del anticuerpo, o del fragmento de anticuerpo, y en particular una modulación de la capacidad de la región Fc del anticuerpo para unirse al receptor de Fc y mediar en las funciones efectoras.

15 En ciertas otras realizaciones, la presente invención se extiende a un anticuerpo aislado que comprende un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:1, o un variante que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con esta, y un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:4, o un variante que tiene al menos 90% de identidad de homología de secuencia con esta.

20 En ciertas otras realizaciones, se proporciona un anticuerpo formado por una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o un variante que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con esta, y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, o un variante que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con esta.

25 Se apreciará que los dominios variables y constantes de las cadenas ligera y pesada para su uso para producir los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden incluir variantes de estos dominios, por ejemplo, dichos dominios variables y constantes pueden comprender una o más variaciones de aminoácidos, comparado con la secuencia de esos dominios según se describe en la presente. Se apreciará que los dominios constantes del variante pueden ser más largos o más cortos que los dominios constantes descritos en la presente. En ciertas realizaciones, los dominios variables o constantes del variante pueden tener una homología de secuencia de al menos 90% de identidad o similitud con un dominio constante de anticuerpo de tipo salvaje.

30 Tal como se define en la presente, la "homología de secuencia" también puede denominarse identidad de secuencia o similitud de secuencia. El término "identidad" o la expresión "identidad de secuencia", tal como se emplea en la presente, significa que, en cualquier posición concreta en la secuencia alineada, el resto aminoácido es idéntico entre las secuencias alineadas. El término "similitud" o la expresión "similitud de secuencia", tal como se emplea en la presente, significa que, en cualquier posición concreta en la secuencia alineada, el resto aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por un resto isoleucina o valina. Esto puede denominarse una sustitución conservativa. Preferiblemente, cuando las secuencias de aminoácidos de la invención se modifican mediante una sustitución conservativa de cualquiera de los restos aminoácidos contenidos en ellas, estos cambios no tienen ningún efecto sobre la especificidad de unión o la actividad funcional del anticuerpo resultante cuando se compara con el anticuerpo no modificado.

La homología de secuencia o la identidad de secuencia con respecto a un polipéptido (nativo) de la invención y su

5 derivado funcional se relaciona con el porcentaje de restos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del correspondiente polipéptido nativo, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y no considerando ninguna de las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. No debe considerarse que las extensiones N- o C-terminales o las inserciones reduzcan la identidad u homología de secuencia. Los métodos y programas informáticos para realizar el alineamiento de dos o más secuencias de aminoácidos y la determinación de su identidad u homología de secuencia son muy conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el porcentaje de identidad o similitud de 2 secuencias de aminoácidos puede calcularse con facilidad utilizando algoritmos, por ejemplo, BLAST (Altschul *et al.*, 1990), FASTA (Pearson y Lipman, 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman, 1981).

10 También se describe un anticuerpo totalmente humanizado que presenta especificidad de unión con el epitopo presente en el receptor de tipo Toll 2 que es reconocido por el anticuerpo monoclonal murino T2.5, en el que dicho anticuerpo humanizado comprende:

- una región variable de cadena ligera en el que la región variable comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,
- 15 - una cadena pesada en la que el dominio variable comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con al menos una molécula efectora o indicadora.

20 En otros aspectos, la presente invención se extiende a un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado, denominado OPN-305, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. El anticuerpo OPN-305 también puede definirse como que tiene una cadena ligera que consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y una cadena pesada que consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

25 La expresión “consiste fundamentalmente en” o “consistiendo fundamentalmente en”, tal como se emplea en la presente, significa que un polipéptido puede tener características o elementos adicionales más allá de los descritos, con la condición de que estas características o elementos adicionales no afecten sustancialmente a la capacidad del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo para que tenga especificidad de unión con el receptor de tipo Toll 2. Es decir, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos también pueden tener características o elementos adicionales que no interfieren con la capacidad del anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos para unirse al receptor de tipo Toll 2 y antagonizar la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2, tales como modificaciones introducidas en la secuencia de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste fundamentalmente en una secuencia especificada puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos adicionales, en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia, con la condición de que los aminoácidos adicionales no interfieran, inhiban, bloqueen o interrumpen el papel del polipéptido en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. De modo similar, una molécula de polipéptido que interviene en los anticuerpos antagonistas del receptor de tipo Toll 2 de la invención puede modificarse químicamente con uno o más grupos funcionales, con la condición de dichos grupos funcionales no interfieran con la capacidad del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo para unirse al receptor de tipo Toll 2 y antagonizar su función.

40 También se describe un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado aislado, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y/o un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

45 Tal como se define en la presente, un anticuerpo “totalmente humanizado” se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que las regiones de marco (FR), las regiones constantes (CR) y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humanas. Además, si el anticuerpo contiene regiones constantes, entonces estas regiones constantes también se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humanas. Los anticuerpos totalmente humanizados de la invención pueden incluir restos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina humanas, tales como mutaciones introducidas al azar, o mutagénesis dirigida específica de sitio *in vitro*. Sin embargo, un anticuerpo totalmente humanizado no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como ratones, han sido injertadas en secuencias marco humanas. Un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado es un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y que tiene regiones variables en las que tanto la región de marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Esto se diferencia, por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal humanizado, en el que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias marco humanas.

55 Cuando solo se proporciona la secuencia de aminoácidos de la secuencia pesada variable (VH) o ligera variable (VL), se proporcionan métodos para producir anticuerpos que se unen al dominio extracelular del receptor de tipo Toll 2, en particular el receptor de tipo Toll 2 de mamífero, generalmente el receptor de tipo Toll 2 humano, en los

que dichos anticuerpos actúan para antagonizar la función del receptor de tipo Toll 2, mediante la selección de dichas secuencias de dominio variable frente a un banco de secuencias de dominios variables complementarias según las indicaciones de Portolano *et al.* (Portolano *et al.*, The Journal of Immunology (1993), 150:880-887), y Clarkson *et al.* (Clarkson *et al.*, Nature (1991), 352:624-628).

5 En la presente se describe un anticuerpo aislado que se une específicamente al receptor de tipo Toll 2 humano, comprendiendo dicho anticuerpo un dominio variable de cadena pesada que comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. El anticuerpo
10 aislado puede ser un anticuerpo aislado sustancialmente puro que esté sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas. El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, es decir, el anticuerpo se ha fabricado mediante métodos recombinantes.

También se describe en la presente un anticuerpo que se une específicamente al receptor de tipo Toll 2, en el que el anticuerpo consiste, o consiste fundamentalmente en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, en el que el anticuerpo presenta reactividad cruzada (es decir, tiene especificidad de unión) con el receptor de tipo Toll 2
15 expresado en células humanas, murinas y de mono. Generalmente, el anticuerpo se une al receptor de tipo Toll 2 en el sitio de unión al ligando que, cuando es unido por el anticuerpo, evita la activación del receptor de tipo Toll 2 mediante la unión de un agonista ligando al sitio de unión al ligando del receptor de tipo Toll 2.

También se describe una proteína de unión al antígeno mono-específica multivalente que comprende dos, tres, cuatro o más de los anticuerpos según se describió en los anteriores aspectos de la invención, o sus fragmentos, en la que dichos anticuerpos están unidos entre sí mediante una estructura conectora.

En diversos otros aspectos, la presente invención se extiende a miembros de unión o fragmentos de unión al antígeno derivados de los anticuerpos totalmente humanizados de los anteriores aspectos de la invención. Estos fragmentos de unión al antígeno se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al receptor de tipo Toll 2. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. En ciertas realizaciones, los miembros de unión o los fragmentos de unión al antígeno pueden ser miembros de unión aislados. Un miembro de unión o un fragmento de unión al antígeno de la invención puede comprender un fragmento de los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, un fragmento de una molécula de anticuerpo totalmente humanizado, tal como solo la cadena pesada o ligera, o, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En ciertas realizaciones, un miembro de unión generalmente puede comprender, consistir o consistir fundamentalmente en un dominio VH y/o VL de anticuerpo. En la presente también se describen dominios VH de los miembros de unión. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL se encuentran 3 regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), junto con 4 regiones de marco ("FR") asociadas. Un dominio VH generalmente comprende 3 HCDR (regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada), y un dominio VL generalmente comprende 3 LCDR (regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera). Por consiguiente, un miembro de unión puede comprender un dominio VH que comprende, en secuencia, regiones VH CDR1 (o HCDR1), CDR2 (HCDR2) y CDR3 (HCDR3), junto con una pluralidad de regiones de marco asociadas. Un miembro de unión puede comprender, como alternativa o además, un dominio VL que comprende dominios VL CDR1, CDR2 y CDR3, junto con regiones de marco asociadas. Los dominios VH o VL generalmente comprenden cuatro regiones de marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas entre las 3 regiones determinantes de la complementariedad en la siguiente disposición: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

La región variable de la cadena ligera (VL) comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que desempeñan un papel para conferir especificidad de unión al anticuerpo o fragmento de unión. Las regiones determinantes de la complementariedad también se conocen como regiones hipervariables. Las 3 regiones determinantes de la complementariedad se muestran a continuación como SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:9, que se relacionan con VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3.

**VLCDR1: Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Glu-Tyr-Tyr-Gly-Thr-Ser-Leu-Met-Gln
(RASESVEYYGTSLMQ (SEQ ID NO:7))**

VLCDR2: Gly-Ala-Ser-Asn-Val-Glu-Ser (GASNVES (SEQ ID NO:8))

VLCDR3: Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Leu-Pro-Trp-Thr (QQSRKLPWT (SEQ ID NO:9))

La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de un anticuerpo de la presente invención según se muestra en SEQ ID NO:1. La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y la secuencia de aminoácidos deducida. La localización de las regiones VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 se muestra con el subrayado de los restos aminoácidos apropiados que comprenden cada región determinante de la complementariedad (CDR) en la figura 1A.

En la figura 1B, los restos del dominio variable de cadena ligera se numeran de modo convencional según el sistema de numeración diseñado por Kabat *et al.* (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, NIH Publication n.º 91-3242). El sistema de numeración de Kabata se emplea en general cuando se menciona un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada). Este sistema de numeración se emplea en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indique lo contrario. Las denominaciones de restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de la presente invención. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener más o menos aminoácidos que en la numeración de Kabat estricta, que corresponden con un acortamiento o una inserción en un componente estructural, tanto una región de marco como una región determinante de la complementariedad (CDR) de la estructura básica del dominio variable de la cadena pesada o ligera. Puede determinarse la numeración de Kabat correcta de los restos para cualquier anticuerpo concreto mediante el alineamiento de los restos en la secuencia del anticuerpo con una secuencia patrón a la cual se ha aplicado la numeración de Kabat.

VLCDR1 (también denominada VL-CDR1, región determinante de la complementariedad del dominio variable de cadena ligera 1, o CDR-L1) consiste en 15 restos aminoácidos presentes en los restos 24 a 38 de la secuencia del dominio variable de cadena ligera, tal como se muestra en la figura 1A. Estos restos se muestran como los restos 24 a 34 en la figura 1B, en la que se consideran los restos 27, 27a, 27b, 27c y 27d. Así, en el caso de VLCDR1, se toman 15 restos para equipararse con la región CDRL1 definida según Kabat.

VLCDR2 (también denominada VL-CDR2, región determinante de la complementariedad del dominio variable de cadena ligera 2, o CDR-L2), tal como se muestra en la figura 1A, consiste en 7 restos aminoácidos y está colocada en los restos 50 a 56 de la secuencia del dominio variable, tal como se muestra en la figura 1B. Estos restos se correlacionan exactamente con los restos 50 a 56 según se toman para equipararse con la región CDRL2 definida según Kabat.

VLCDR3 (también denominada VL-CDR3, región determinante de la complementariedad del dominio variable de cadena ligera 3, o CDR-L3), tal como se muestra en la figura 1A, consiste en 9 restos aminoácidos y está colocada en los restos 89 a 97 de la secuencia del dominio variable de cadena ligera, tal como se muestra en la figura 1B. Estos restos se correlacionan exactamente con los restos 89 a 97 según se toman para equipararse con la región CDRL3 definida según Kabat.

La región variable de la cadena pesada (VH) también comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que desempeñan un papel para conferir la especificidad de unión al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Las 3 regiones determinantes de la complementariedad se muestra a continuación como SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:12, que se relacionan con VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3.

VHCDR1: Thr-Tyr-Gly-Ile-Asn (TYGIN (SEQ ID NO:10)).

VHCDR2: Trp-Ile-Tyr-Pro-Arg-Asp-Gly-Ser-Thr-Asn-Phe-Asn-Glu-Asn-Phe-Leu-Asp (WIYPRDGSTNFNENFKD (SEQ ID NO:11)).

VHCDR3: Leu-Thr-Gly-Gly-Thr-Phe-Leu-Asp-Tyr (LTGGTFLDY (SEQ ID NO:12)).

La figura 2A muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH según se muestra en SEQ ID NO:2. La figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable y la secuencia de aminoácidos deducida.

En la figura 2B, los restos del dominio variable de cadena pesada se numeran de modo convencional según un sistema diseñado por Kabat (*supra*). La localización de las regiones VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 se muestra mediante el subrayado de los restos aminoácidos apropiados en la figura 2A.

VHCDR1 (también denominada VH-CDR1, región determinante de la complementariedad del dominio variable de cadena pesada 1, o CDR-H1) consiste en 5 restos aminoácidos presentes en los restos 31 a 35 de la secuencia del dominio variable. Estos restos se correlacionan exactamente con los restos 31 a 35 según se toman para equipararse con la región CDRH1 definida según Kabat.

VHCDR2 (también denominada VH-CDR2, región determinante de la complementariedad del dominio variable de cadena pesada 2, o CDR-H2) consiste en 17 restos aminoácidos, y está colocada en los restos 50 a 65 de la secuencia del dominio variable. Estos restos se correlacionan exactamente con los restos 50 a 65 según se toman para equipararse con la región CDRH2 definida según Kabat.

5 VHCDR3 (también denominada VH-CDR3, región determinante de la complementariedad del dominio variable de
 10 cadena pesada 3, o CDR-H3) consiste en 9 restos aminoácidos, y está colocada en los restos 95 a 103 de la
 secuencia del dominio variable de cadena ligera. Debido a la presencia de 2 restos en la posición 100 y 100a, que
 se considera que se alinean con el resto 100 de la región CDRH3 de la región CDRH3 derivada de Kabat, según se
 ilustra en la figura 2B, estos 9 restos se correlacionan exactamente con los 8 restos (restos 95 a 102) de la región
 CDRH2 definida según Kabat.

15 Las CDR de la cadena ligera se asocian con las CDR de la cadena pesada para conferir la especificidad de unión a
 un anticuerpo, o a un fragmento de unión de un anticuerpo, en los casos en que ambos conjuntos de CDR estén
 presentes. Se sabe que la contribución realizada por la región variable de cadena ligera a la energética de la unión
 es pequeña, con relación a la región variable de cadena pesada asociada. Por consiguiente, se sabe que las
 20 regiones de cadena pesada aisladas, que comprenden, en secuencia, las 3 regiones determinantes de la
 complementariedad (VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3) tienen capacidad de unión al antígeno y se denominan
 habitualmente anticuerpos de un solo dominio. Estos fragmentos de anticuerpos son proporcionados por la presente
 invención, basándose en el suministro del dominio variable de cadena pesada de la presente invención, tal como el
 definido en SEQ ID NO:4.

25 En la presente se describe un anticuerpo totalmente humanizado, o un miembro de unión relacionado, que presenta
 especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 (TLR2, TLR-2, CD282), y que comprende, consiste, o consiste
 fundamentalmente en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO:7
 a SEQ ID NO:12. En ciertas realizaciones, el miembro de unión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ
 ID NO:10, 11 y 12. También se describe un miembro de unión que comprende, consiste, o consiste
 30 fundamentalmente, en secuencia, en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID
 NO:12. Cada una de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12 puede proporcionarse en secuencia, con las
 regiones de marco intercaladas entre ellas.

35 En ciertas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de los dominios VH o VL pueden comprender al menos una
 retromutación, siendo dicha retromutación la sustitución de un resto aminoácido en una posición específica de la
 secuencia, para mejorar la especificidad de unión del anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos, por TLR2
 y/o para potenciar la eficacia terapéutica del anticuerpo humanizado como antagonista de TLR2. Generalmente, esta
 modificación puede realizarse en los restos de marco dentro de las regiones variables de cadena ligera y pesada
 para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. En ciertas realizaciones, pueden utilizarse otras técnicas de
 40 modificación para modificar los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, incluyendo modificaciones de la
 región Fc que puedan alterar la semivida sérica, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la
 citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, en ciertas realizaciones, pueden producirse anticuerpos o
 fragmentos de anticuerpos que tengan patrones de glicosilación alterados. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de
 la invención se altera para aumentar o disminuir el grado en el que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de
 polipéptidos generalmente se presenta N-enlazada u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de un resto
 45 carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y
 asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento
 para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de
 estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación O-enlazada
 se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa al hidroxiaminoácido, de modo
 más habitual serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

En ciertas otras realizaciones, los anticuerpos pueden PEGilarse haciendo reaccionar el anticuerpo con un derivado
 de polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, el anticuerpo se defucosila y, por tanto, carece de restos fucosa.

50 En ciertas realizaciones, las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden realizarse
 seleccionando sustituciones que afectan (a) a la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución,
 por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) a la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio
 diana, o (c) a la voluminosidad de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según sus similitudes en las
 propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, en *Biochemistry*, 2ª edición, pp. 73-75, Worth Publishers,
 Nueva York (1975)): (1) no polares - Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares
 55 sin carga - Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos - Asp (D), Glu (E); (4) básicos: Lys
 (K), Arg (R), His (H). Como alternativa, los restos que aparecen en la naturaleza pueden dividirse en grupos basados
 en sus propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos - norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos
 neutros - Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos - Asp, Glu; (4) básicos - His, Lys, Arg; (5) restos que influyen en la
 orientación de la cadena - Gly, Pro; (6) aromáticos - Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservativas implican
 60 intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos restos sustituidos también pueden introducirse
 en los sitios de sustitución conservativa o en el resto de los sitios (por ejemplo, no conservados).

También se describe el uso del dominio VL de SEQ ID NO:1 y/o el dominio VH de SEQ ID NO:4 para la formación de un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos, en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2, y en el que dicho anticuerpo o fragmento actúa para antagonizar la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2.

5 En ciertas otras realizaciones, la presente invención se extiende a un miembro de unión que presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 y que actúa como antagonista de TLR2, en el que dicho miembro de unión comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:4, o secuencias que tienen una homología de secuencia de aminoácidos de al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente al menos 98% con ella.

10 En ciertos otros aspectos, la invención se extiende a un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado, denominado OPN-305, que se caracteriza en los siguientes ejemplos. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de las cadenas ligeras (VL) de OPN-305 se muestra en SEQ ID NO:1, mientras que la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada (VH) de OPN-305 se muestra en SEQ ID NO:4. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de OPN-305 se muestra en SEQ ID NO:5, mientras que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de OPN-305 se muestra en SEQ ID NO:2.

15 El anticuerpo puede producirse por medios recombinantes, tales como un cultivo celular o, como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado. En ciertas realizaciones, pueden realizarse más modificaciones en la porción Fc de la cadena pesada, y en particular en los dominios constantes CH2 y CH3 del anticuerpo. En estas realizaciones, el anticuepo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4. En ciertas realizaciones, puede obtenerse un fragmento de unión a partir del anticuerpo totalmente humanizado OPN-305, tal como un fragmento Fab, un fragmento F'ab o un sc-Fv.

20 También se describe un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de esta descripción, o una de sus porciones de unión al antígeno, unido a una molécula compañera. Este conjugado de anticuerpo-molécula compañera puede conjugarse a través de un conector químico, tal como un conector de peptidilo, un conector de hidrazina o un conector de disulfuro. El compañero de acoplamiento puede ser una molécula efectora, marcador, fármaco, o molécula portadora. Las técnicas adecuadas para acoplar los anticuerpos de la invención a compañeros de acoplamiento de peptidilo y no peptidilo son conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen marcadores detectables, tales como un radiomarcador, o un marcador enzimático, tal como peroxidasa de rábano, o restos químicos, tales como biotina. Como alternativa, el marcador puede ser un marcador funcional, por ejemplo, ricina, o profármacos que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de unión del anticuerpo.

25 También se describe una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una de sus porciones de unión al antígeno, unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la de dicho anticuerpo o dicha porción de unión al antígeno de este.

30 También se describe un anticuerpo monoclonal, un fragmento de unión derivado de un anticuerpo, un péptido, un oligonucleótido, un peptidomimético o un compuesto orgánico que se une específicamente al mismo epitopo presente en el dominio extracelular del receptor de tipo Toll 2 al que se une el anticuerpo monoclonal OPN-305, en el que el anticuerpo monoclonal no es el anticuerpo disponible en el mercado denominado T2.5. Estos compuestos tienen la capacidad de presentar competencia cruzada con los anticuerpos descritos en la presente por unirse al receptor de tipo Toll 2 en el mismo epitopo. Estos compuestos pueden identificarse mediante estudios de unión de competencia cruzada, que pueden realizarse contra un anticuerpo de la presente invención, tal como OPN-305.

35 En diversos otros aspectos, la presente invención se extiende a un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado o un miembro de unión derivado de estos según la presente invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que está mediado, en su totalidad o en parte, por la señalización intracelular y/o la activación del receptor de tipo Toll 2.

En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno mediado por TLR2 es un trastorno inflamatorio.

40 En ciertas realizaciones, el miembro de unión puede seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a un fragmento Fab, un fragmento Fab', un scFv (fragmento variable monocatenario), un peptidomimético y un diacuerpo, o un derivado multivalente relacionado.

45 Las técnicas utilizadas para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ son muy conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen las descritas en la publicación de patente internacional PCT WO 92/22324, Sawai *et al.*, "Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and CDNA Expression Vectors", 1995, AJRI, 34:26-34; y Mullinax *et al.*, "Expression of Heterodimeric Fab Antibody Protein in One Cloning Step", 1992, BioTechniques, 12(6):864-869; y Better *et al.*, "Escherichia coli Secretion of an Active Chimeric Antibody Fragment", 1988, Science, 240:1041-1043.

Los ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir scFv (fragmentos Fv monocatenarios) se describen en Huston *et al.*, "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", *Methods in Enzymology*, vol. 203:46-88 (1991).

5 En ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa mediante digestión proteolítica según el método de Morimoto (Morimoto *et al.*, "Single-step purification of F(ab')₂ sub
2 fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992)). Ahora también pueden producirse fragmentos de anticuerpos directamente a partir de células hospedantes (véase Carter *et al.*, "High Level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody
10 fragment", *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)).

También se describe un método para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno inflamatorio que está mediado, en su totalidad o en parte, por el receptor de tipo Toll 2, comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos de unión, según la presente invención, y
- 15 - administrarlo a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

El método puede implicar la administración de una proteína de unión al antígeno monoespecífica multivalente que comprende dos, tres, cuatro o más anticuerpos según la invención.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monoclonal humanizado, una porción de unión al antígeno de estos, un inmunoconjugado o una molécula
20 biespecífica según se describe en la presente, junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La formulación puede ser una formulación líquida, una formulación liofilizada, una formulación liofilizada que se reconstituye como un líquido, o una formulación en aerosol. El anticuerpo en la formulación puede estar a una
25 concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

La formulación también puede comprender un tampón. Generalmente, el pH de la formulación es de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5.

30 El tampón puede comprender un tampón histidina de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 60 mM, tampón succinato de aproximadamente 5 M a aproximadamente 25 mM, o tampón acetato de aproximadamente 5 mM a 25 mM. El tampón puede comprender cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a 300 mM, generalmente a una concentración de aproximadamente 125 mM, y citrato de sodio a una concentración de
35 aproximadamente 5 mM a 50 mM, generalmente 25 mM. La formulación también puede comprender un tensioactivo a una concentración de aproximadamente 0% a aproximadamente 0,2%. El tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste, pero no se limita a polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-80, polisorbato-85, y sus combinaciones. El tensioactivo puede ser polisorbato-20. La formulación también puede comprender Tween de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,05%, y también puede comprender cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 125 mM y citrato de sodio a una concentración de
40 aproximadamente 25 mM.

La composición farmacéutica también puede comprender o puede administrarse a un sujeto junto con al menos un compuesto inmunomodulador, tal como un compuesto inmunosupresor, un anticuerpo secundario o uno de sus fragmentos, o una proteína recombinante.

45 El anticuerpo y los miembros de unión de la presente invención también pueden utilizarse para el diagnóstico, por ejemplo, el diagnóstico y la formación de imágenes *in vivo* de estados de enfermedad que implican al receptor de tipo Toll 2, en el que el anticuerpo de la invención puede utilizarse para dirigirse y unirse a células que expresan el receptor de tipo Toll 2. Además, un compuesto o molécula secundaria puede unirse al anticuerpo de la invención para su uso para dirigir dicho compuesto o molécula secundaria a células que expresan el receptor de tipo Toll 2.

También se describe un kit para el tratamiento o la prevención de un trastorno o una enfermedad mediada por el receptor de tipo Toll 2. El kit puede comprender un anticuerpo según la presente invención, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, que es capaz de unirse al receptor de tipo Toll 2 y antagonizar su actividad funcional, e instrucciones para la administración de este a un paciente.
50

También se describe un anticuerpo neutralizante humanizado, o una de sus porciones de unión al antígeno, en el que el anticuerpo se une específicamente al receptor de tipo Toll 2 de mamífero con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, pero no se une a CD32 (receptor Fc gamma II), en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epitopo presente en el dominio extracelular del receptor de tipo Toll 2 al cual se une el anticuerpo disponible en el mercado
55

denominado T2.5.

5 También se describe un anticuerpo monoclonal aislado, o una de sus porciones de unión al antígeno, que se une a un epitopo sobre el receptor de tipo Toll 2 de mamífero con una K_D de 1×10^{-8} M o menor, y que no se une a CD32 (receptor Fc gamma II), en el que el epitopo es reconocido por un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

También se describe un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una de sus porciones de unión al antígeno, que se une específicamente al receptor de tipo Toll 2 de mamífero y muestra las siguientes propiedades:

- se une al receptor de tipo Toll 2 de mamífero con una K_D de 1×10^{-8} M o menor,
- 10 - no se une a CD32 (receptor Fc gamma II),
- presenta reactividad cruzada con el receptor de tipo Toll 2 humano, el receptor de tipo Toll 2 murino, y el receptor de tipo Toll 2 de mono.

Miembros de unión a Fab

15 En ciertas realizaciones de los anteriores aspectos de la invención, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo o una porción de unión al antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen un fragmento Fab, F'ab o F(ab')₂, que es un fragmento monovalente que consiste, o consiste fundamentalmente en los dominios VL, VH, CL y CH1 de un anticuerpo heterotetramero. En ciertas realizaciones, el dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

20 En ciertas realizaciones, los dominios CL y CH1 se basan en la secuencia de aminoácidos de un dominio CL y CH1 de una inmunoglobulina de la subclase IgG e isotipo IgG4, o de los dominios CL y CH1, tal como se muestra en SEQ ID NO:5 de la figura 5. El fragmento Fab de esta realización de la invención puede utilizarse para el tratamiento o la profilaxis de trastornos que incluyen, pero no se limitan a psoriasis, dermatitis y enfermedad ocular que incluye uveitis y AMD (degeneración macular relacionada con la edad).

Miembros de unión a dominios únicos de unión

25 Además de proporcionar un anticuerpo monoclonal humanizado que presenta especificidad de unión con TLR2 y que antagoniza la función de TLR2, en la presente también se describen miembros de unión distintos de anticuerpos, que comprende una pareja de dominios de unión basados en la secuencia de aminoácidos de una región VL (variable de cadena ligera), según se define en SEQ ID NO:1, y una secuencia de aminoácidos de una región VH (variable de cadena pesada), según se define en SEQ ID NO:4. En particular, en la presente se describen dominios únicos de unión que se basan en la región VL o VH de los anticuerpos humanizados de la invención.

30 Por consiguiente, en la presente se describe un miembro de unión que comprende, consiste, o consiste fundamentalmente en un dominio único de unión derivado del anticuerpo humanizado de la invención. El dominio único de unión puede derivarse de la secuencia de aminoácidos de VH (dominio variable de cadena pesada), según se define en SEQ ID NO:4. Este dominio de unión puede utilizarse como agente de transporte dirigido a TLR2, puesto que se sabe que los dominios VH de inmunoglobulinas son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica.

Modificación de restos de CDR

40 Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de las regiones de complementariedad (según se definen en SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 y 12), así como las secuencias de las regiones variables e hipervariables, pueden modificarse sin perder la capacidad para unirse específicamente a TLR2. Por ejemplo, las regiones CDR de los miembros de unión derivados de los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden ser idénticas o muy homólogas (por ejemplo, 95% de identidad de secuencia o mayor) con las secuencias de aminoácidos definidas en la presente en SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 y 12. Tal como se define en la presente, la expresión "muy homólogo" significa que pueden realizarse de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos en las secuencias de las CDR. En ciertas realizaciones, el grado de homología que existe entre las respectivas CDR, las regiones hipervariables o las regiones variables y sus homólogos no modificados será al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferiblemente mayor que 98%. Estas secuencias modificadas se encuentran dentro del alcance de la presente invención en los casos en que el miembro de unión modificado u homólogo conserve la capacidad de unirse específicamente a TLR2 y de antagonizar su actividad funcional.

Polinucleótidos

50 En diversos otros aspectos, la presente invención se extiende a polinucleótidos, y en particular a polinucleótidos aislados, que codifican anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos y miembros de unión de la presente invención.

Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:4. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un polinucleótido aislado.

5 Tal como se define en la presente, un "polinucleótido" incluye cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado, que incluye, sin limitación, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias.

10 Un polinucleótido de la invención, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido o polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:4, incluye sus variantes alélicas y/o sus complementos, que incluyen un polinucleótido que se hibrida con dichas secuencias de nucleótidos bajo condiciones de rigurosidad moderada o alta.

En diversos otros aspectos, la invención se extiende a un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:4. Además, la invención se extiende a una célula hospedante transformada con dicho vector.

Líneas celulares de hibridoma

15 Otro aspecto de la invención proporciona una línea celular híbrida (hibridoma), que expresa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:1 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1A muestra la SEQ ID NO:1 que es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de una cadena ligera de un anticuerpo según la invención. La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (SEQ ID NO:17) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:18) que se ha numerado según Kabat.

25 La figura 2A muestra la SEQ ID NO:4 que es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de una cadena pesada de un anticuerpo según la invención. La figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (SEQ ID NO:19) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:20), que se ha numerado según Kabat.

La figura 3 muestra la SEQ ID NO:2 que muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo según la invención

La figura 4 muestra la SEQ ID NO:3, que muestra la secuencia del ácido nucleico que puede traducirse para codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

30 La figura 5 muestra la SEQ ID NO:5 que es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo según la invención

La figura 6 muestra la SEQ ID NO:6, que es la secuencia del ácido nucleico que puede traducirse para codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

35 La figura 7 muestra la SEQ ID NO:15, que proporciona la secuencia de aminoácidos del receptor de tipo Toll 2 humano.

La figura 8 muestra la SEQ ID NO:16, que proporciona la secuencia de aminoácidos del receptor de tipo toll 2 murino.

40 La figura 9 demuestra que el antagonismo del receptor de tipo Toll 2 mediado por OPN-305 no depende de la unión del anticuerpo a CD32, mostrando el grupo 1 la adición de un anticuerpo de cabra control, mostrando el grupo 2 la adición de un anticuerpo de bloqueo anti-hCD32a de cabra, y mostrando el grupo 3 la adición de un anticuerpo de bloqueo anti-hCD32b de cabra.

La figura 10 demuestra que el antagonismo del receptor de tipo Toll 2 mediado por el anticuerpo monoclonal OPN301 depende de la unión del anticuerpo a CD32 (figura 10A), mientras que el antagonismo del receptor de tipo Toll 2 mediado por OPN-305 no depende de la unión del anticuerpo a CD32 (figura 10B).

45 La figura 11 muestra los resultados de análisis FACS que demuestran que OPN-305 presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 humano (figura 11A), mientras que un anticuerpo control de isotipo IgG4 no compite con OPN-301 por la unión al receptor de tipo Toll 2 (figura 11B).

La figura 12 demuestra que OPN-305 (OPN-305-21) suprime las respuestas de TLR2 murino de una manera equivalente al anticuerpo OPN-301 murino.

50 La figura 13 muestra 3 señales de análisis FACS que demuestran que OPN-305 se une al TLR2 de mono que se

expresa sobre granulocitos (figura 13A) y monocitos (figura 13B), pero no sobre linfocitos (figura 13C).

La figura 14 muestra 2 señales de análisis FACS que demuestran que OPN-305 compite con el anticuerpo monoclonal murino anti-TLR2 OPN-301 por la unión al TLR2 de mono, mientras que la figura 14(A) muestra los resultados para los granulocitos y la figura 14(B) muestra los resultados para monocitos.

5 Las figuras 15(A) y (B) muestran señales de muestras de anticuerpos que se han refinado mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna 16/60 Sephacryl S200. La figura 15(A) muestra un anticuerpo quimérico anti-TLR2. La figura 15(B) muestra el anticuerpo OPN305 (VK5/VH4). En cada caso, se recogió el pico del monómero que abarca las fracciones B8 a B4.

10 La figura 16 muestra la preselección de muestras de ensayo para la citotoxicidad y la actividad de modulación de células T ensayadas en 4 muestras de donantes. La muestra 1 (primera columna de cada grupo (barra negra)) es un anticuerpo anti-TLR2 quimérico, la muestra 2 (segunda columna de cada grupo de resultados (barra blanca)) es VK5/VH4 (OPN305), la muestra 3 (tercera barra (gris oscuro)) es un anticuerpo comparativo denominado VK5/VH5 junto con KLH, mientras que la muestra 4 (cuarta barra a la derecha de cada grupo (gris claro)) es un control solo con KLH. Los resultados muestran los recuentos de células viables en el día 7. Los IE de las muestras incubadas en presencia de KLH se compararon con los de KLH solo. Los IE se promediaron a lo largo del periodo de toma de
15 muestras de cuatro días. El límite de exclusión para determinar las respuestas positivas con un IE ≥ 2 .

Las figuras 17(A), (B) y (C) muestran 3 diagramas de barras que muestran los resultados de un ensayo EpiScreen. Se ensayaron los anticuerpos quiméricos anti-TLR2, VK5/VH4 y VK5/VH5 en ensayos de células T de desarrollo en el tiempo EpiScreen™ utilizando PBMC de 21 donantes. Los cultivos madre de PBMC incubadas con anticuerpos de
20 ensayo se muestrearon en los días 5, 6, 7 y 8, y se pulsaron con ³H-timidina. Las células se recolectaron y se midió la incorporación de radiactividad mediante recuento de centelleo. Los resultados para cada muestra por triplicado se promediaron y se normalizaron mediante la conversión al índice de estimulación (IE). El IE para cada momento del tiempo con cada donante se muestra arriba para (a) el anticuerpo quimérico, (b) el anticuerpo anti-TLR2 OPN-305 (denominado VK5/VH4), (c) un anticuerpo anti-TLR2 comparativo denominado VK5/VH5. El límite de exclusión para
25 determinar las respuestas positivas con un IE ≥ 2 se destaca por la línea horizontal negra gruesa y se indican (*) las respuestas significativas ($p < 0,05$ en un ensayo de la t de Student).

La figura 18 muestra una comparación de la inmunogenicidad predicha utilizando la tecnología EPISCREEN™ y la inmunogenicidad observada en un entorno clínico. Se ensayaron 16 proteínas terapéuticas para su riesgo relativo de
30 inmunogenicidad utilizando la tecnología EPISCREEN™. Los resultados se representaron gráficamente frente a la frecuencia de inmunogenicidad (respuestas anti-anticuerpos terapéuticos) observada para cada proteína cuando se emplea en la clínica (datos procedentes de PubMed). Se muestra la línea de regresión y el coeficiente de correlación.

La figura 19 muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-TLR2 OPN-305 (SEQ ID NO:22) y el anticuerpo monoclonal anti-TLR2 murino T2.5 (SEQ
35 ID NO:21), en el que se demuestra que la identidad de secuencia determinada es del 89,2%.

La figura 20 muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-TLR2 OPN-305 (SEQ ID NO:24) y el anticuerpo monoclonal anti-TLR2 murino T2.5 (SEQ
ID NO:23), en el que se demuestra que la identidad de secuencia determinada es del 88,1%.

40 La figura 21 demuestra que la inhibición completa de la señalización dependiente de TLR2 se logra con menos de la unión máxima al receptor de OPN-305. Se observa la inhibición de la actividad NF-kB de una manera dependiente de la dosis después de un tratamiento con Pam3Csk4 (figuras 21A y B). El OPN305 inhibe casi completamente la actividad NF-kB a unas concentraciones de 2 ug/ml (figura 21C).

La figura 22A demuestra la actividad SEAP dependiente de NF-Kb frente a [Pam3CSK4], mientras que la figura 22B un diagrama de Lineweaver Burk de 1/V frente a 1/S.

45 La figura 23 muestra 3 diagramas A, B y C que demuestran que las respuestas mediadas por el receptor de tipo Toll a la flagelina (TLR5, figura 23C) y LPS (TLR4, figura 23B) no se alteraron cuando se compara con células control no expuestas a OPN-305. Tal como se esperaba, las respuestas mediadas por el receptor de tipo Toll 2 a Pam3CSK y FSL-1 fueron bloqueadas por OPN-305 (figura 23A). Esto sugiere que OPN-305 no está produciendo ningún aumento o disminución inesperada en las respuesta de TLR4 o TLR5 a los ligandos.

50 La figura 24 demuestra que el anticuerpo monoclonal OPN-305 inhibe la sepsis inducida por Pam3Csk4. Se trataron grupos de ratones BALB/c hembra (n = 4) con OPN-305 a las dosis indicadas 30 minutos antes del tratamiento con 100 ug de Pam3Csk4.

La figura 25 demuestra que OPN305 inhibe la sepsis inducida por Pam3Csk4. En este experimento, OPN305 se
55 administra por vía intravenosa 30 minutos antes de la administración intraperitoneal de 100 ug de Pam3Csk4. Cuatro horas después, los ratones se sacrificaron mediante una anestesia letal y se extrajo sangre. Se obtuvo el suero y se

determinaron las concentraciones de citoquinas mediante ELISA. El suero se diluyó a 1/10 para la ELISA de KC e IL 12p40, y a 1/5 para la ELISA de IL-6.

La figura 26 demuestra que TLR2 se expresa sobre macrófagos alveolares de rata (NR8383) y se detecta utilizando OPN305. (A) células no teñidas; (B) control positivo, anticuerpo primario anti-TLR2 de rata de conejo policlonal, el anticuerpo secundario es anti-conejo Alexa-Fluor 488; (C) células tratadas con IgG4 humana policlonal, el anticuerpo secundario es anti-IgG4 humana PE; (D) células teñidas con OPN305, el anticuerpo secundario es anti-IgG4 humana PE.

La figura 27 demuestra que TLR2 se expresa sobre PBMC porcinas y es teñido por OPN305. Las PBMC se purificaron mediante una separación utilizando Ficoll. A-C representan las PBMC del cerdo 666, y D-F del cerdo 488. A, D no está teñido; B, E está marcado con IgG4 humana policlonal, seguido de una tinción secundaria con anti-IgG4 humana marcada con PE; C, F está marcado con OPN305, seguido por anti-IgG4 humana marcada con PE.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal totalmente humano que presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 y que, cuando se une al receptor de tipo Toll 2, antagoniza la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2. La invención también proporciona fragmentos de unión derivados del anticuerpo totalmente humano y miembros de unión que comprenden, consisten, o consisten fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena ligera de SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable de SEQ ID NO:4.

La expresión “función antagonizante del receptor de tipo Toll 2”, o expresiones similares, tales como “antagonista del receptor de tipo Toll 2” o “agonista del receptor de tipo Toll 2”, significan que el anticuerpo, el fragmento o el miembro de unión se une específicamente al receptor de tipo Toll 2 e inhibe o bloquea la unión de un ligando o compuesto de unión al receptor de tipo Toll 2 que, a su vez, provoca la activación del receptor de tipo Toll 2, por ejemplo, un ligando del receptor de tipo Toll 2. El anticuerpo, el fragmento o el miembro de unión también puede inhibir la activación y la función del receptor de tipo Toll 2 inhibiendo o suprimiendo la señalización intracelular mediada por el receptor de tipo Toll 2 tras la unión de un ligando del receptor de tipo Toll 2. La “activación y la señalización mediada corriente abajo del receptor de tipo Toll 2” significa cualquier vía de señalización intracelular que es inducida por la activación del TLR2. La vía de señalización puede ser una vía específica de TLR2, o puede ser una vía de señalización “compartida”, por ejemplo, cuando la vía de señalización puede ser activada por otras fuentes, por ejemplo, mediante la activación de receptores distintos del TLR2 que contribuyen a la activación de mediadores de la respuesta inmunológica, tales como el factor de transcripción NF-kappaB.

Se sabe que el TLR2 dimeriza en 2 heterodímeros funcionales. En particular, se sabe que el TLR2 forma un heterodímero con el receptor de tipo Toll 1 o el receptor de tipo Toll 6. Es posible que se formen otros heterodímeros con el receptor de tipo Toll 4 (TLR4, TLR-4) y el receptor de tipo Toll 10 (TLR10, TLR-10). Se cree que esta dimerización está asociada con una discriminación que da como resultado la unión de TLR2 por diferentes ligandos derivados de microbios. El inventor ha descubierto que los anticuerpos humanizados de la invención actúan para antagonizar la función de TLR2 independientemente de si el receptor de tipo Toll 2 forma un heterodímero con el receptor de tipo Toll 1 o con el receptor de tipo Toll 6.

Epitopo de unión a anticuerpos

Los anticuerpos humanizados de la invención, o sus fragmentos, o los miembros de unión basados en estos, se unen selectivamente al receptor de tipo Toll 2 y antagonizan su función. Los anticuerpos monoclonales pueden bloquear la activación de un receptor por su ligando uniéndose cerca del sitio de unión al ligando del receptor, dando esto como resultado un impedimento estérico que evita el acceso del ligando al sitio de unión al ligando.

Reactividad cruzada

Generalmente, el TLR2 que es antagonizado por los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos o los miembros de unión de la invención es un TLR2 de mamífero (o uno de sus variantes funcionales), por ejemplo, TLR2 humano o TLR2 murino. En ciertas realizaciones, el TLR2 antagonizado es la forma humana de TLR2 que tiene la secuencia de aminoácidos definida en la figura 7 como SEQ ID NO:15, que comprende la secuencia de longitud completa de 784 aminoácidos del receptor de tipo Toll humano según se define en Genbank n.º de registro AAC 34133 (URL www.ncbi.nlm.nih.gov).

En ciertas otras realizaciones, el receptor de tipo Toll 2 es el TLR2 murino, que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la figura 8 como SEQ ID NO:16, derivada de Genbank n.º de registro NP_036035 (*Mus musculus*).

En ciertas otras realizaciones, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos o los miembros de unión de la invención actúan para antagonizar la actividad funcional o la señalización del receptor de tipo Toll 2 expresado sobre células de mono.

5 En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo puede tener una constante de disociación (Kd) seleccionada del grupo que consiste en (i) una constante de disociación de entre 10^{-7} M y 10^{-11} M; (ii) una constante de disociación de entre 10^{-8} M y 10^{-9} M; (iii) una constante de disociación de entre 10^{-9} M y 10^{-10} M; (iv) una constante de disociación de entre 10^{-11} M y 10^{-12} M. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención, o sus fragmentos, pueden unirse al receptor de tipo Toll 2 humano o murino con una Kd de 3×10^{-8} M o menor, o de 4×10^{-8} M o menor.

Por tanto, la unión de un anticuerpo de la invención al receptor de tipo Toll 2 da como resultado el bloqueo de la señalización intracelular que está asociada con la interacción del ligando/receptor de TLR2 y su ligando.

Estructura del anticuerpo

10 El anticuerpo y los fragmentos del anticuerpo de la invención son totalmente humanos. Es decir, los restos aminoácidos que comprenden el anticuerpo se derivan de la especie humana en oposición, por ejemplo, a un ratón. Por tanto, el anticuerpo de la invención es menos inmunogénico que un anticuerpo murino o un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo de ratón/humano.

15 La inmunogenicidad que surge de la administración de un anticuerpo murino o quimérico ha demostrado ser la barrera más significativa al uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales. Por consiguiente, el suministro de un anticuerpo totalmente humano soluciona los problemas asociados con el suministro de anticuerpos murinos, o quiméricos de humano/ratón, que, cuando se administran a un sujeto más de una vez, pueden provocar una reacción inmunogénica, tal como una respuesta HAMA, que se dirige contra el anticuerpo. Esta respuesta elimina el anticuerpo murino o quimérico del suero del sujeto, evitando con ello que los anticuerpos alcancen su diana y produzcan su efecto terapéutico previsto. Por consiguiente, el anticuerpo totalmente humano de la presente invención confiere una ventaja significativa frente a dichos anticuerpos murinos y quiméricos.

20 Una causa intrínseca de inmunogenicidad contra un anticuerpo son los epitopos de células T CD4+ presentes sobre el anticuerpo. Por consiguiente, el anticuerpo y los fragmentos de unión de la presente invención se han analizado para identificar y modificar cualquier epitopo de células T CD4+ presente sobre el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo. Este proceso reduce aún más la inmunogenicidad del anticuerpo y los fragmentos de anticuerpos de la invención.

Además, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden someterse a una o más técnicas que también pueden utilizarse para asegurarse de que no se organice una respuesta inmunológica contra el anticuerpo cuando se administra a un sujeto. Los ejemplos de dichas técnicas serán conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a una desinmunización, un barajado de genes y una PEGilación.

30 Además, para potenciar la función biológica o la actividad terapéutica de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, pueden emplearse otras técnicas de optimización. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a modificar los siguientes atributos del anticuerpo: potencia, afinidad, especificidad de unión, K_{on} (constante de velocidad de asociación), K_{off} (constante de velocidad de disociación), estabilidad termodinámica, solubilidad, semivida sérica, expresión, cinética de plegamiento, susceptibilidad a proteasas, función efectora de la región Fc y reciclaje de fármacos. La función biológica o actividad terapéutica que puede modularse incluye, pero no se limita a la potenciación de la eficacia, un mejor perfil farmacocinético, una mayor comodidad para el paciente, un menor coste de los artículos, un mejor perfil de seguridad, una menor inmunogenicidad y una mayor caducidad.

Tratamiento de una enfermedad mediada por TLR2

40 Los anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos y miembros de unión de la invención pueden inducir una inmunosupresión (supresión de una respuesta inmunológica, más en concreto una respuesta inmunológica proinflamatoria), en particular suprimiendo la activación y la señalización mediada por el receptor de tipo Toll 2. Esta supresión de la función del receptor de tipo Toll 2 ha sido identificada por la invención como que tiene utilidad en el tratamiento o la prevención de trastornos de enfermedad en los que la activación y la señalización del receptor de tipo Toll 2 contribuye a la aparición o el avance de la enfermedad.

45 Un anticuerpo de la invención puede utilizarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En ciertos otros aspectos, la invención se extiende a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miembros de unión de la invención para su uso en el tratamiento de trastornos de enfermedad mediados por la activación y la señalización del receptor de tipo Toll 2.

Tratamiento de la isquemia

50 Por consiguiente, en la presente se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de una lesión por isquemia-reperfusión, o un trastorno provocado por esta o asociado a esta, comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos de unión, según se define en la presente, y

- administrar dicho compuesto a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

5 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo totalmente humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para su uso en el tratamiento de una lesión por isquemia-reperfusión o un trastorno inflamatorio cardíaco que está mediado, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

También se describe el uso de un anticuerpo humanizado según la presente invención, o uno de sus fragmentos, o un miembro de unión derivado de este, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una lesión por isquemia-reperfusión o un trastorno inflamatorio cardíaco que está mediado, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

10 En ciertas realizaciones, el trastorno inflamatorio cardíaco es el resultado de la aparición de una lesión por reperfusión y puede seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a isquemia miocárdica, enfermedad cardíaca isquémica, isquemia miocárdica por hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, isquemia de tejidos, isquemia de órganos, síndrome coronario agudo, hipertrofia, infarto cerebral, infarto de miocardio, arritmia y lesión por isquemia-reperfusión (lesión I/R).

15 La isquemia es provocada cuando un órgano o una parte del cuerpo no recibe suficiente suministro sanguíneo. Un órgano que se ve privado de un suministro sanguíneo adecuado se dice que es hipóxico. La reperfusión se produce cuando vuelve el flujo sanguíneo a un órgano después de una privación temporal. La lesión por reperfusión se refiere a los daños que se producen en un tejido o un órgano tras el retorno del suministro sanguíneo a un tejido después de un periodo de isquemia. La ausencia de oxígeno y nutrientes durante el periodo de la isquemia da como resultado un periodo de inflamación y daños oxidativos cuando vuelve la circulación. Los ejemplos de lesiones por isquemia-reperfusión incluyen hipoxia, ictus, ataque cardíaco, insuficiencia renal crónica o trasplante de órganos.

20 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención puede utilizarse para el tratamiento o la prevención de una lesión por isquemia-reperfusión que puede ser el resultado de un trasplante de órganos en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención puede utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de la isquemia que puede ser el resultado de un trasplante de órganos sólidos.

25 También se describe un método para reducir una o más actividades biológicas del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) en una célula o un tejido que expresa TLR2 implicado en una lesión por isquemia-reperfusión asociada con el trasplante de órganos sólidos en un sujeto, que comprende:

30 - poner en contacto la célula o el tejido con un anticuerpo antagonista del receptor de tipo Toll 2 según la presente invención, en una cantidad suficiente para reducir una o más actividades biológicas del TLR2 en la célula o el tejido.

35 La célula o el tejido que expresa TLR2 puede ser una célula o un tejido del miocardio. La célula o el tejido que expresa TLR2 puede ser una célula o un tejido implicado en un trastorno inflamatorio cardíaco inducido por reperfusión seleccionado del grupo que comprende, pero no se limita a isquemia miocárdica, enfermedad cardíaca isquémica, isquemia miocárdica por hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, isquemia de tejidos, isquemia de órganos, síndrome coronario agudo, hipertrofia, infarto cerebral, infarto de miocardio, arritmia y lesión por isquemia-reperfusión (lesión I/R).

El método puede realizarse en un sujeto humano que padece, o está en riesgo de padecer, una lesión por isquemia-reperfusión.

40 Otro aspecto de la presente invención se extiende a un anticuerpo según la presente invención, o uno de sus fragmentos de unión, para su uso para tratar o prevenir la isquemia y la reperfusión asociadas con el trasplante de órganos sólidos.

Tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

También se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, o un trastorno asociado con esta, comprendiendo dicho método las etapas de:

45 - proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos de unión, según se define en la presente, y

- administrar dicho compuesto a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

50 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para su uso para tratar una enfermedad autoinmunitaria que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

También se describe el uso de un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad

autoinmunológica que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

5 En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunológica es la artritis autoinmunológica, en particular la artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunológica se selecciona del grupo que comprende psoriasis, dermatitis. En ciertas otras realizaciones, la enfermedad autoinmunológica es la diabetes. Generalmente, la diabetes es la diabetes mellitus. En ciertas realizaciones, la diabetes es la diabetes mellitus de tipo 1. En ciertas otras realizaciones, la diabetes es la diabetes mellitus de tipo 2.

10 En ciertas realizaciones, el trastorno que surge por que el sujeto tiene diabetes puede denominarse una complicación diabética. Estas complicaciones diabéticas pueden ser complicaciones agudas, complicaciones crónicas o una combinación de ambas.

15 Cuando la complicación diabética es una complicación aguda, la complicación puede seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a retinopatía, neuropatía, trastornos de la circulación periférica, úlceras de la piel, poliuria, polidipsia, polifagia, cetoacidosis diabética (DKA) y estado no cetótico hiperosmolar. En ciertas otras realizaciones, el trastorno puede ser un trastorno que resulta de uno cualquiera de los anteriores trastornos agudos o crónicos y puede incluir, pero no se limita a ceguera, proteinurea, dolor, entumecimiento, psicorrestesia, claudicación intermitente y gangrena.

20 En ciertas otras realizaciones, la complicación diabética puede ser una complicación crónica, tal como una enfermedad vascular que resulta del aumento crónico de los niveles de glucosa sanguínea que conduce a daños en los vasos sanguíneos (angiopatía). En estas realizaciones, cuando el daño vascular se produce en vasos sanguíneos pequeños, esto puede conducir a una microangiopatía, que puede conducir a uno o más de retinopatía diabética, neuropatía diabética y nefropatía diabética.

25 También se describe un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la obesidad en un sujeto que está mediado, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según cualquiera de los anteriores aspectos de la presente invención, o un miembro de unión derivado de este.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para su uso para tratar y/o prevenir la obesidad que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

30 También se describe el uso de un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de enfermedad que está asociado con la obesidad, en el que el trastorno está provocado, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

35 En ciertas realizaciones, el trastorno asociado con la obesidad es al menos un trastorno seleccionado del grupo que comprende, pero no se limita a diabetes mellitus de tipo 2, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, menor eliminación de glucosa, dislipidemia, enfermedad del hígado graso no alcohólica, hipertensión, inflamación, hepatomegalia, esteatosis hepática, infarto de miocardio, asma o ictus.

También se describe un método para tratar la resistencia a la insulina en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la presente invención, o un miembro de unión proporcionado por la presente invención.

40 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo humanizado, uno de sus fragmentos, o un miembro de unión derivado de este, para su uso para tratar la resistencia a la insulina en un sujeto que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

45 También se describe el uso de un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina en un sujeto que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

Tratamiento de una enfermedad ocular

También se describen métodos para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad ocular, en los que dichos métodos comprenden las etapas de:

- 50
- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión o un miembro de unión proporcionado por la presente invención, y
 - administrar dicho compuesto a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular.

En ciertas realizaciones, la enfermedad ocular es la uveítis o la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

5 Tratamiento de la inflamación renal

También se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad y la inflamación renal, o de un trastorno provocado por estos o asociados a estos, comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión o un miembro de unión proporcionado por la presente invención, y

10 - administrar dicho compuesto a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para su uso para tratar la inflamación renal o la enfermedad renal que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

15 También se describe el uso de un anticuerpo humanizado según la presente invención, o un miembro de unión derivado de este, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la inflamación renal o la enfermedad renal que está mediada, en su totalidad o en parte, por la activación del receptor de tipo Toll 2 por un ligando del receptor de tipo Toll 2.

20 Tal como se definen en la presente, las expresiones “inflamación renal” y “enfermedad renal” se extienden a trastornos que se caracterizan sustancialmente por la aparición de una inflamación dentro del riñón, o células del riñón, o en los que la aparición de la inflamación en el riñón es provocada por una enfermedad o un trastorno inflamatorio que afecta principalmente a un sitio dentro del cuerpo diferente del riñón. En particular, la inflamación puede aparecer en un sitio que incluye, pero no se limita a los glomérulos, cápsula de Bowman o espacio de Bowman. Generalmente, la inflamación produce un deterioro al menos parcial de la función renal y/o insuficiencia renal.

25 En ciertas realizaciones, la enfermedad y la inflamación renal incluye la “enfermedad de riñón”, en la que la expresión enfermedad de riñón se refiere en general a un trastorno de al menos un riñón en un ser humano, en el que el trastorno compromete o deteriora la función del riñón o riñones, y esto se caracteriza fisiológicamente, por ejemplo, por la filtración de proteínas hacia la orina, o por la excreción de residuos nitrogenados. La enfermedad del riñón también puede ser el resultado de una patología primaria del riñón, tal como lesiones en los glomérulos o los túbulos, o daños en otro órgano, tal como el páncreas, que afectan de modo adverso a la capacidad del riñón para realizar funciones biológicas, tales como la retención de proteínas. Así, la enfermedad de riñón en el ser humano puede ser el efecto directo o indirecto de un trastorno de enfermedad que puede afectar a otros órganos. Los ejemplos de enfermedades que afectan a los riñones, pero cuyo objetivo específico no son los riñones, son la diabetes y el lupus sistémico. Las expresiones enfermedad renal y enfermedad de riñón se emplean de modo intercambiable en la presente con la expresión “enfermedades del riñón”. La enfermedad de riñón también puede ser el resultado o ser la consecuencia, por ejemplo, de cualquier cambio, daño o traumatismo en los glomérulos, túbulos o tejido intersticial de la corteza renal o de la médula renal.

30 En ciertas realizaciones, la enfermedad de riñón también puede ser una enfermedad de riñón progresiva. La expresión “enfermedad de riñón progresiva”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier enfermedad del riñón que, a lo largo del tiempo (por ejemplo, días, semanas, meses, años), conduce a una pérdida de la función renal. Tal como se define en la presente, la expresión “función renal” en general se refiere a una propiedad fisiológica del riñón, tal como la capacidad para retener proteínas, evitando así la proteinuria (por ejemplo, albuminuria). La función renal puede evaluarse, por ejemplo, mediante la velocidad de filtración glomerular (por ejemplo, eliminación de creatinina), la excreción de proteína en la orina, por ejemplo, albuminuria, el nitrógeno de urea sanguíneo, la creatinina plasmática o sérica, o cualquiera de sus combinaciones.

35 Los ejemplos de trastornos específicos que se incluyen en el significado de la expresión “inflamación y enfermedad renal” incluyen, pero no se limitan a trastornos renales que incluyen, pero no se limitan a insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, nefritis nefrotóxica heteróloga, glomerulonefritis, esclerosis del glomérulo, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefropatía diabética, nefropatía diabética en la que la nefropatía diabética acompaña a la esclerosis del hígado, y glomerulonefritis en la que la glomerulonefritis viene acompañada por la esclerosis del hígado.

40 En ciertas otras realizaciones, la inflamación y la enfermedad renal pueden relacionarse con una enfermedad inmunológicamente mediada que afecta a las células del riñón y/o la función del riñón. Estos trastornos pueden incluir, pero no se limitan a nefropatía de inmunoglobulina A, glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis no proliferativa, glomerulonefritis membranosa,

5 enfermedad de cambios mínimos, glomeruloesclerosis segmental focal primaria (FSGS), glomerulonefritis fibrilar, glomerulonefritis inmunitaria, glomerulonefritis proliferativa, glomerulonefritis progresiva, enfermedad anti-GBM, isquemia del riñón, vasculitis del riñón, que incluye enfermedad asociada con anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA) (por ejemplo, granulomatosis de Wegener), glomerulonefritis asociada a crioglobulinemia de nefritis de lupus, endocarditis bacteriana, púrpura de Henoch-Schönlein, glomerulonefritis postinfecciosa, hepatitis C, nefropatía diabética, miloidosis, nefroesclerosis hipertensiva, enfermedad de la cadena ligera del mieloma múltiple, glomeruloesclerosis focal secundaria, y nefroesclerosis hipertensiva.

10 La expresión "inflamación y enfermedad renal" también incluye la insuficiencia renal aguda. La insuficiencia renal aguda ("acute renal failure", ARF) se refiere a los trastornos clínicos asociados con una azotemia rápida en aumento constante, con o sin oliguria (<500 ml/día). La causa de la ARF puede agruparse en tres categorías de diagnóstico: prerrenal (perfusión renal inadecuada), posrenal (obstrucción), y renal. La patofisiología de la ARF es compleja y multifactorial. Los conceptos actuales sugieren que la ARF puede ser el resultado de una lesión tubular renal directa, de isquemia renal o de obstrucción intratubular. Desde el punto de vista clínico, la ARF produce una disminución de la filtración glomerular y una secreción reducida de productos de desecho metabólicos, agua, y electrolitos. La sobrecarga de fluidos, el desequilibrio de electrolitos y el síndrome urémico provocan la disfunción de los órganos. La disfunción de los órganos puede conducir, en último término, a la muerte.

20 También se describen métodos para modular una función (por ejemplo, alterar una o más actividades biológicas del TLR2) en una célula y/o tejido que responde a TLR2 (por ejemplo, un tejido que ha sufrido isquemia, que puede sufrir isquemia, o que puede sufrir reperfusión, una célula beta de los islotes de Langerhans del páncreas, o cualquier otro tipo de célula que expresa TLR2 y que está implicada en un trastorno de enfermedad mediado por TLR2, o en su desarrollo). El método incluye poner en contacto la célula que responde a TLR2 y/o el tejido que responde a TLR2 con un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos de unión, proporcionados por la invención, en una cantidad suficiente para antagonizar la función de la célula o el tejido que responde a TLR2, o la actividad biológica del TLR2 en la célula o el tejido. La etapa de contacto puede realizarse *in vitro*, por ejemplo, en un lisado celular o en un sistema reconstituido. Como alternativa, este método puede realizarse con células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, pueden cultivarse células, tales como células purificadas o recombinantes, *in vitro*, y la etapa de contacto puede realizarse añadiendo el modulador de TLR2 al medio de cultivo. Generalmente, la célula que responde a TLR2 es una célula de mamífero, tal como una célula humana. El tejido que responde a TLR2 puede ser un tejido que ha sufrido isquemia y que puede sufrir reperfusión, o es una población celular asociada a este. El método puede realizarse en células presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo*, o en un sujeto animal (que incluye, por ejemplo, un sujeto humano, o un modelo animal *in vivo*). El protocolo *in vivo* puede ser terapéutico o profiláctico, y el modelo inflamatorio puede ser, por ejemplo, un modelo genéticamente modificado, tal como un modelo animal que sobreexpresa TLR2, o una mutación o una delección en un receptor TLR. Para los métodos *in vivo*, el anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos, puede proporcionarse solo o en combinación con otro agente, tal como un producto terapéutico secundario, tal como un fármaco antiinflamatorio, o un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Generalmente, el anticuerpo se administra a un sujeto que padece, o está en riesgo de padecer el trastorno mediado por TLR2, tal como artritis reumatoide, lesión por isquemia-reperfusión, diabetes o inflamación renal, en una cantidad suficiente para antagonizar una o más actividades o funciones mediadas por TLR2 en el sujeto. La cantidad o la dosificación del anticuerpo humanizado anti-TLR2 de la invención que se administra puede ser determinada antes de la administración mediante el ensayo *in vitro* o *ex vivo* de la cantidad de anticuerpo requerida para alterar, por ejemplo, disminuir o inhibir, una o más actividades funcionales del TLR2, siendo generalmente dicha actividad funcional una o más de las actividades biológicas del TLR2 descritas en la presente.

45 Se entiende que cualquiera de los anteriores métodos terapéuticos puede realizarse utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar o además de los anticuerpos anti-TLR2, o un fragmento de unión del anticuerpo de la invención.

50 También se describe el uso de los anticuerpos de la presente invención en aplicaciones de diagnóstico. Como tal, también se describe un método para diagnosticar un trastorno asociado con una mayor expresión del receptor de tipo Toll 2. El método puede comprender poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-TLR2 de la invención; determinar el nivel de expresión (de modo cuantitativo o cualitativo) del TLR2 por la célula de ensayo mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-TLR2 al TLR2; y comparar el nivel de expresión del TLR2 por la célula de ensayo con el nivel de expresión del TLR2 por una célula control (por ejemplo, una célula normal procedente del mismo tejido que la célula de ensayo, o una célula que exprese TLR2 a unos niveles comparables a dicha célula normal), en el que un mayor nivel de expresión del TLR2 por la célula de ensayo, comparado con la célula control, indica la presencia de un trastorno asociado con una mayor expresión de TLR2. La célula de ensayo puede obtenerse a partir de un individuo sospechoso de padecer un trastorno asociado con una mayor expresión de TLR2. El trastorno puede ser un trastorno inflamatorio o un trastorno inmunológicamente mediado, tal como se describió anteriormente en la presente.

Efecto terapéutico

60 El inventor ha descubierto que el anticuerpo anti-TLR2 humanizado que se proporciona en la presente es más

deseable, desde el punto de vista terapéutico, que los anticuerpos monoclonales murinos anti-TLR2 que son conocidos en la técnica.

Además de las diferencia estructurales que existen entre los dominios variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos humanizados de la invención y los anticuerpos anti-TLR2 murinos de la técnica anterior, el inventor también ha identificado, de modo sorprendente, una serie de ventajas funcionales conferidas por el anticuerpo humanizado de la presente invención que harían que el uso de este anticuerpo sea más preferible en un entorno clínico.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, el inventor ha descubierto que, cuando se compara con el anticuerpo monoclonal murino anti-TLR2 11G7, el anticuerpo totalmente humanizado según la presente invención muestra mayor utilidad funcional y clínica, puesto que el anticuerpo antagoniza la función de TLR2 independientemente de si el TLR2 forma un heterodímero con TLR1 o TLR6.

Con relación al anticuerpo TL2.1 murino, el inventor ha descubierto que el anticuerpo humanizado de la presente invención presenta reactividad cruzada con diferentes formas de TLR2 de mamíferos, tales como la forma humana, murina, de rata, cerdo y mono, mientras que el anticuerpo TL2.1 murino solo muestra especificidad de unión al TLR2 humano.

Además, el anticuerpo humanizado de la presente invención no incluye restos aminoácidos murinos y, por consiguiente, la probabilidad de que se generen anticuerpos neutralizantes contra este cuando se administra a un sujeto es mínima, cuando se compara con el anticuerpo TL2.1 murino.

Con respecto al anticuerpo T2.5, el inventor ha descubierto, de modo sorprendente, que el anticuerpo T2.5 (un anticuerpo del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) de ratón, derivado del clon de hibridoma T2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, EEUU, n.º de catálogo 1054) media en el antagonismo de la activación y la señalización del TLR2, y esto se produce de una manera dependiente de CD32. El inventor ha descubierto que los anticuerpos totalmente humanizados de la presente invención no requieren CD32 para mediar en la supresión de la señalización de TLR2, es decir, no es necesaria la unión a CD32, por ejemplo, por la región Fc del anticuerpo para mediar en el antagonismo del receptor TLR2 cuando es unido por la porción Fab del anticuerpo. Por consiguiente, el antagonismo de la función del receptor de tipo Toll 2 que es mediado por el anticuerpo monoclonal totalmente humanizado OPN-305 de la presente invención es mediado de una manera independiente de CD32. Esto incluye la unión a CD32a y CD32b. Esta sorprendente observación, que ha sido realizada por el inventor, es importante desde el punto de vista clínico, puesto que el anticuerpo totalmente humanizado de la presente invención tiene potencialmente mayor acceso a los pacientes.

Además, tal como se ejemplifica en los ejemplos comparativos proporcionados en la presente, el inventor ha confirmado que el anticuerpo totalmente humanizado de la presente invención muestra un reducido perfil de inmunogenicidad, es decir, que los anticuerpos son menos inmunogénicos debido a la falta de epitopos de células T. Por consiguiente, es muy poco probable que se genere una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos según la invención cuando se administran a un sujeto humano. Esta característica funcional significa que el anticuerpo totalmente humanizado de la presente invención es mucho más deseable para su uso en un entorno clínico que los anticuerpos murinos TL2.1, T2.5 y 11G7 que son conocidos en la técnica, o que anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados que pueden desarrollarse basándose en técnicas de injerto de CDR tradicionales.

Anticuerpos

Un "anticuerpo" es una inmunoglobulina, natural, o producida parcial o totalmente de modo sintético. El término también incluye cualquier polipéptido, proteína o péptido que tenga un dominio de unión que es, o es homólogo con el dominio de unión de los anticuerpos humanizados de la invención.

Las inmunoglobulinas generalmente tienen una estructura heterotetrámera que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera comprende un dominio variable que confiere la especificidad de unión del antígeno, conociéndose estos dominios como dominios VH y VL para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Cada cadena también comprende al menos un dominio constante, y la cadena ligera comprende un único dominio constante, denominado CL, mientras que el dominio pesado comprende tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3. Algunos isotipos de anticuerpos también incluyen otro dominio constante denominado dominio CH4. En los seres humanos, existen 5 clases diferentes de anticuerpos, concretamente: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.

El dominio Fc de un anticuerpo generalmente comprende los 2 últimos dominios de región constante de cadena pesada de cada cadena. Estos dimerizan para formar el dominio Fc que es responsable de mediar en las funciones efectoras del anticuerpo, tales como ADCC y la fijación al complemento. La región Fc del anticuerpo también desempeña un papel en la semivida en circulación del anticuerpo. Pueden realizarse modificaciones en el dominio Fc para modular la función del anticuerpo.

Puesto que los anticuerpos pueden modificarse mediante una serie de formas, debe considerarse que el término “anticuerpo” incluye cualquier miembro de unión específica que tenga la misma especificidad de unión que los anticuerpos humanizados de la presente invención. Por consiguiente, el término “anticuerpo” incluye fragmentos de anticuerpos y homólogos, así como cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina que tenga especificidad de unión al receptor de tipo Toll 2 y que actúe para antagonizar la función de TLR2.

Además, se sabe que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Los ejemplos de estos fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a: (i) fragmentos Fab que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH1 de un anticuerpo heterotetrámero; (ii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisaga; (iii) fragmentos Fab', un fragmento Fab con parte de la región bisagra; (iv) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH1 de un anticuerpo heterotetrámero; (v) fragmentos Fv que consisten en los dominios VH y VL de un anticuerpo heterotetrámero; (vi) scFv (moléculas de Fv monocatenario), en los que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico; (vii) una CDR aislada, tal como VHCDR3; y (viii) diacuerpos, que son multímeros de polipéptidos que pueden ser multivalentes o fragmentos multiespecíficos producidos mediante técnicas de fusión génica.

También se describen anticuerpos biespecíficos. Estos pueden incluir anticuerpos biespecíficos convencionales que pueden prepararse a través de medios de conjugación química, o a través de líneas de células de hibridoma híbridas. Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos pueden derivarse de fragmentos de anticuerpos biespecíficos, tales como dímeros de scFv o diacuerpos. Pueden utilizarse dímeros de scFv en lugar de anticuerpos completos. Estos diacuerpos pueden construirse utilizando solo dominios variables y, por tanto, se proporcionan sin una región Fc, puesto que dicha estructura reduce la posible aparición de una respuesta inmunológica antiidiotípica o HAMA.

Los restos aminoácidos en los dominios de anticuerpos se numeran de modo convencional según el sistema diseñado por Kabat *et al.* (URL - www.kabatdatabase.com). Esta numeración se emplea en la presente memoria descriptiva, excepto cuando se indique lo contrario.

Peptidomiméticos

También se describen peptidomiméticos que están basados en los anticuerpos de la presente invención o sus fragmentos de unión. Tal como se emplean en la presente, el término “peptidomimético” o la expresión “péptido mimético” se refieren a moléculas que no son polipéptidos, pero que imitan aspectos de sus estructuras y que, en el contexto de la presente invención, se unen específicamente al receptor de tipo Toll 2, de una manera que produce que se antagonice la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2. En la presente se describen peptidomiméticos basados en los anticuerpos de la invención que actúan como antagonistas del receptor de tipo Toll 2.

Pueden prepararse antagonistas de peptidomiméticos mediante métodos químicos convencionales (véase, por ejemplo, Damewood, J.R., “Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry”, en *Reviews in Computational Biology*, 2007, vol. 9, pp. 1-80, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1996; Kazmierski, W.K., “Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols”, Humana Press, Nueva Jersey, 1999). Pueden prepararse peptidomiméticos que sean antagonistas del receptor de tipo Toll 2, en los que dichos peptidomiméticos estén basados en los anticuerpos de la presente invención y, en particular, basados en las regiones variables de cadena pesada y ligera. Por ejemplo, pueden prepararse polisacáridos que tienen los mismos grupos funcionales que los péptidos. Pueden diseñarse peptidomiméticos, por ejemplo, estableciendo la estructura tridimensional de un agente peptídico en el entorno en que se une o se unirá a una molécula diana. El peptidomimético comprende al menos dos componentes, el resto o restos de unión y el esqueleto o estructura de soporte.

Los restos de unión son los grupos o átomos químicos que reaccionarán o formarán un complejo (por ejemplo, a través de interacciones hidrófobas o iónicas) con una molécula diana, por ejemplo, con el aminoácido o aminoácidos en el sitio de unión al ligando o cerca de este. Por ejemplo, los restos de unión en un peptidomimético pueden ser los mismos que los que se encuentran en un antagonista de proteínas o péptidos. Los restos de unión pueden ser un grupo químico o átomo que reacciona con el receptor de tipo Toll 2 de una manera igual o similar que los anticuerpos de la presente invención. Los ejemplos de restos de unión adecuados para su uso en el diseño de peptidomiméticos para un aminoácido básico en un péptido incluyen grupos que contienen nitrógeno, tales como aminas, amonios, guanidinas y amidas de fosfonios. Los ejemplos de restos de unión adecuados para su uso en el diseño de peptidomiméticos para un aminoácido ácido incluyen, por ejemplo, carboxilo, éster de ácido carboxílico de alquilo inferior, ácido sulfónico, un éster de ácido sulfónico de alquilo inferior, o un ácido fosforoso o su éster.

La estructura de soporte es la entidad química que, cuando se une al resto o restos de unión, proporciona la configuración tridimensional del peptidomimético. La estructura de soporte puede ser orgánica o inorgánica. Los ejemplos de estructuras de soporte orgánicas incluyen polisacáridos, polímeros u oligómeros de polímeros sintéticos orgánicos (tales como poli(alcohol vinílico) o polilactida). Se prefiere que la estructura de soporte posea sustancialmente el mismo tamaño y dimensiones que el esqueleto peptídico o estructura de soporte. Esto puede determinarse calculando o midiendo el tamaño de los átomos y enlaces del péptido y peptidomimético. El nitrógeno del enlace peptídico puede sustituirse por oxígeno o azufre, por ejemplo, formando un esqueleto de poliéster. El

carbonilo puede sustituirse por un grupo sulfonilo o un grupo sulfínico, formando con ello una poliamida (por ejemplo, una polisulfonamida). Pueden prepararse amidas inversas del péptido (por ejemplo, sustituyendo uno o más grupos -CONH- por un grupo -NHCO-). El esqueleto peptídico puede sustituirse por un esqueleto de polisilano.

Estos compuestos pueden fabricarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, puede prepararse un peptidomimético de poliéster sustituyendo un grupo hidroxilo por el correspondiente grupo α -amino sobre aminoácidos, preparando con ello un hidroxilácido y esterificando secuencialmente los hidroxilácidos, opcionalmente bloqueando las cadenas laterales básicas y ácidas para minimizar las reacciones secundarias. La determinación de la vía de síntesis química apropiada puede realizarse con facilidad tras determinar la estructura química.

Pueden sintetizarse peptidomiméticos y ensamblarse en bancos que comprenden de unas pocas a muchas especies moleculares discretas. Estos bancos pueden prepararse utilizando métodos conocidos de química combinatoria, y pueden seleccionarse para determinar si el banco comprende uno o más peptidomiméticos que tengan la actividad deseada. Estos antagonistas de peptidomiméticos después pueden aislarse mediante métodos adecuados.

En la presente también se describen peptidomiméticos que se diseñan basándose en los paratopos de los anticuerpos de unión al receptor de tipo Toll 2 de la presente invención. En particular, estos peptidomiméticos se basan en la estructura de las regiones CDR de los anticuerpos descritos en la presente. Las técnicas para la producción de estos peptidomiméticos son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen el método de Dougall *et al.* ("Design of pharmacologic agents based on antibody structure", Trends in Biotechnology, 1994, 12, pp. 372-379), y también las técnicas de Saragovi *et al.* (Saragovi, *et al.*, "Design and Synthesis of a Mimetic from an Antibody Complementarity-Determining Region", Science, 253:792-795 (1991); y Saragovi *et al.*, "Loops and Secondary Structure Mimetics: Development and Applications in Basic Science and Rational Drug Design", Biotechnology, 10:773-778 (1992)). Estos peptidomiméticos pueden basarse, en particular, en la CDR3 de la cadena pesada. Williams, *et al.* (Williams *et al.*, "Design of Bioactive Peptides Based on Antibody Hypervariable Region Structures", J. Biol. Chem., 266:5182-5160 (1991)) describen el aislamiento y la síntesis de péptidos conformacionalmente constreñidos derivados de las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera de anticuerpos. Esta CDR es particularmente importante para la especificidad de unión de un anticuerpo como consecuencia del complejo mecanismo genético que influye en su estructura, que provoca que tenga bucles de medianos a largos que tienen diversos patrones de interacciones. Las propiedades conformacionales de los bucles o vueltas inversas del péptido se consideran mediadores importantes en la actividad biológica de polipéptidos. Las vueltas proporcionan orientaciones adecuadas de los grupos de unión fundamentales para la bioactividad mediante la estabilización de una conformación plegada en una molécula pequeña y pueden estar implicadas en sitios de unión y de reconocimiento.

También se describen miméticos de anticuerpos, tales como Affibodies, anticuerpos de dominio, nanocuerpos, UniBodies, DARPins, anticalinas, avímeros, versacuerpos y duocalinas que se basan en los anticuerpos del receptor de tipo Toll 2 de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de tecnologías de miméticos de anticuerpos. Por ejemplo, los denominados anticuerpos de dominio (Domantis, Reino Unido) son pequeñas unidades de unión funcionales de anticuerpos que se corresponden con las regiones variables de las cadenas ligera o pesada de anticuerpos humanos. Pueden encontrarse instrucciones para la producción de estos anticuerpos de dominio en la patente de EEUU n.º 6.291.158, patente de EEUU n.º 6.582.915, y patente de EEUU n.º 6.593.081. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen exclusivas propiedades estructurales y funcionales de anticuerpos de cadena pesada naturales que se encuentran en camélidos. Los unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos, basados en la eliminación de la región bisagra de anticuerpos IgG4. La delección de la región de bisagra produce una molécula cuyo tamaño es aproximadamente la mitad de un anticuerpo IgG4 tradicional y que tiene una región de unión univalente. Los unicuerpos conservan la propiedad de los anticuerpos IgG4 de ser inertes y, por tanto, no inducen respuestas inmunológicas. Por tanto, al igual que los productos terapéuticos basados en anticuerpos IgG4, tales como las realizaciones de los anticuerpos de la presente invención descritas en la presente, los unicuerpos pueden utilizarse para antagonizar funciones específicas de células, pero la muerte celular generalmente no se producirá, puesto que el unicuerpo, al igual que un anticuerpo IgG4, no media en una respuesta inmunológica contra la diana a la cual se une. Los unicuerpos se eliminan del cuerpo a una velocidad similar a IgG4 y se unen con una afinidad de unión similar a sus antígenos diana.

Otras moléculas de unión incluyen: moléculas de Affibodies (patente de EEUU 5.831.012), DARPins (proteínas de repetición de anquirina diseñadas) (publicación de solicitud de patente PCT internacional WO 02/20565) y anticalinas (patente de EEUU n.º 7.250.297 y documento WO 99/16873). Los versacuerpos son otra tecnología de miméticos de anticuerpos. Los versacuerpos (Amunix, publicación de solicitud de patente de EEUU n.º 2007/0191272) son proteínas pequeñas, denominadas microproteínas, de 3-5 kDa con más de 15% de restos cisteína, que forman un andamiaje con alta densidad en enlaces disulfuro que sustituye al núcleo hidrófobo que presentan generalmente las proteínas.

Los avímeros son otro tipo de mimético de anticuerpo. Los avímeros se originan a partir de la recombinación de familias de proteínas séricas humanas. Son cadenas de proteínas sencillas compuestas de dominios de unión modulares, cada uno de los cuales está diseñado para unirse a un sitio diana concreto. Los avímeros pueden unirse

simultáneamente a sitios sobre una única diana de proteína y/o sitios sobre múltiples dianas de proteínas. Conocido como avides o unión de múltiples puntos, este mecanismo de unión imita la forma en que las células y las moléculas interactúan en el cuerpo, apoya la generación de antagonistas y agonistas, y produce fármacos con múltiples funciones y potente actividad. Pueden producirse bancos de avímeros según el documento WO 2004/044011, y en particular en el ejemplo 6 de la página 99, y, por ejemplo, las solicitudes de patente de EEUU (publicaciones) n.ºs US 2005/0053973, US2005/0089932, US2005/0164301. Los bancos de avímeros también están disponibles en el mercado en Avidia Inc, Mountain View, California, EEUU.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos y los miembros de unión de la invención pueden producirse en su totalidad o en parte mediante síntesis química. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión de la invención pueden prepararse mediante técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica, tales como la síntesis de péptidos en líquidos convencional, o mediante métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Como alternativa, los anticuerpos y los miembros de unión pueden prepararse en disolución utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase líquida, o también mediante una combinación de química en fase sólida, en fase líquida y en disolución.

La presente invención también incluye la producción de anticuerpos o miembros de unión de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica al menos una secuencia de aminoácidos que comprende un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado, de modo que pueda codificarse un péptido o polipéptido deseado.

Por ejemplo, puede expresarse un ácido nucleico que codifica los aminoácidos de la cadena ligera y un segundo ácido nucleico que codifica los aminoácidos de la cadena pesada para proporcionar un anticuerpo de la presente invención.

Por consiguiente, en ciertos otros aspectos de la invención, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que forman los anticuerpos o los miembros de unión de la presente invención.

Generalmente, los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos que forman los anticuerpos o los miembros de unión de la presente invención pueden proporcionarse en una forma aislada o purificada, o proporcionarse en una forma que esté sustancialmente exenta de materiales con los que están asociados en la naturaleza, con la excepción de una o más secuencias reguladoras. Un ácido nucleico que expresa un anticuerpo o un miembro de unión de la invención puede ser total o parcialmente sintético y puede incluir, pero no se limita a ADN, ADNc y ARN.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o los miembros de unión de la invención pueden ser preparadas con facilidad por los expertos en la técnica utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, volúmenes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773), y Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 4ª edición, 1999 (ISBN - 0471250929). Estas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de ácidos nucleicos, (ii) síntesis química, o (iii) preparación de secuencias de ADNc. Puede generarse ADN que codifica anticuerpos o miembros de unión de la invención y utilizarse en cualquier forma adecuada conocida por los expertos en la técnica, que incluye tomar ADN codificador, identificar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas en cada lado de la porción que se va a expresar, y cortar y retirar dicha porción del ADN. La porción cortada después puede unirse operablemente a un promotor adecuado y expresarse en un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión disponible en el mercado. Como alternativa, las porciones pertinentes del ADN pueden amplificarse utilizando cebadores de PCR adecuados. Pueden realizarse modificaciones en las secuencias de ADN utilizando mutagénesis específica dirigida a sitio.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o los miembros de unión de la invención pueden proporcionarse como construcciones en forma de un plásmido, vector, módulo de transcripción o expresión que comprende al menos un ácido nucleico, tal como se describió anteriormente. La construcción puede estar incluida dentro de una célula hospedante recombinante que comprende una o más construcciones como se indicó anteriormente. La expresión puede lograrse de modo conveniente cultivando, bajo condiciones apropiadas, células hospedantes recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos adecuadas. Después de la expresión, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse y/o purificarse utilizando cualquier técnica adecuada, y después utilizarse según sea apropiado.

Los sistemas para la clonación y la expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedantes diferentes son muy conocidos. Las células hospedantes adecuadas incluyen sistemas de bacterias, de células de mamífero, de levaduras, de células de insecto y de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster, y células de mieloma de ratón NS0. Un hospedante bacteriano habitual preferido es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariontes, tales como *E. coli*, está bien establecida en la técnica. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en

la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión.

Los expertos en la técnica conocen las técnicas generales para la producción de anticuerpos, analizándose dichos métodos, por ejemplo, en Kohler y Milstein (1975), Nature 256: 495-497; patente de EEUU n.º 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes se describen en las anteriores referencias y también, por ejemplo, en la patente europea n.º 0.368.684.

En ciertas realizaciones de la invención, se emplean ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica un dominio de variable cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos o miembros de unión. Por definición, estos ácidos nucleicos comprenden la codificación de ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en dichos ácidos nucleicos codificadores y sus ácidos nucleicos complementarios, o estos ácidos nucleicos complementarios (monocatenarios) en sí mismos.

Además, los ácidos nucleicos que codifican un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos pueden ser ácidos nucleicos sintetizados de modo enzimático o químico que tienen la auténtica secuencia codificadora para un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera naturales, o sus mutantes.

Un anticuerpo de la invención puede producirse por medios recombinantes, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de ruptura específica en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una secuencia que es reconocida y procesada (es decir, rota por una peptidasa señal) por la célula hospedante. Para células hospedantes procariontas que no reconocen ni procesan una secuencia señal del anticuerpo nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal de procariontas seleccionada, por ejemplo, del grupo de conductores de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina termoestable II.

Aislados

El término "aislado", cuando se emplea haciendo referencia a los anticuerpos totalmente humanizados de la invención, o a los miembros de unión derivados de estos, o a polipéptidos que los codifican, se refiere al estado en que dichos anticuerpos, miembros de unión o ácidos nucleicos (polinucleótidos) se proporcionan en una forma aislada y/o pura, es decir, se han separado, aislado o purificado a partir de su entorno natural, y se proporcionan en una forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de ácidos nucleicos, exentos o sustancialmente exentos de ácidos nucleicos o genes de un origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Por consiguiente, estos anticuerpos aislados, miembros de unión y ácidos nucleicos aislados estarán exentos o sustancialmente exentos de los materiales con los que están asociados en la naturaleza, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o en el entorno en el que han sido preparados (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación se realiza mediante la tecnología del ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos, los miembros de unión y los ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y todavía, para fines prácticos, se considera que se proporcionan en una forma aislada. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión pueden mezclarse con gelatina u otros vehículos si se emplean para revestir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclan con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se emplean en el diagnóstico o la terapia. Los anticuerpos o los miembros de unión pueden glicosilarse de modo natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO), o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen mediante la expresión en una célula procarionta).

También se describen preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpos anti-TLR2 humanizadas. Por ejemplo, estas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal con diversos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto ácido piroglutámico.

Administración

El anticuerpo monoclonal o el miembro de unión de la presente invención puede administrarse solo, pero preferiblemente se administrará como una composición farmacéutica que en general comprenderá un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado seleccionado según la vía de administración prevista. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen agua, glicerol y etanol.

El anticuerpo monoclonal o el miembro de unión de la presente invención puede administrarse a un paciente que necesite tratamiento a través de cualquier vía adecuada. Generalmente, la composición puede administrarse por vía parenteral mediante inyección o infusión. Los ejemplos de vías preferidas para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a intravenosa, intracardíaca, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea,

transmucósica, por inhalación o transdérmica. Las vías de administración también pueden incluir la vía tópica y entérica, por ejemplo, mucósica (que incluye pulmonar), oral, nasal o rectal.

5 Cuando la composición se administra como una composición inyectable, por ejemplo, en una aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, el ingrediente activo puede estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que es apirógena y tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuadas. Los expertos en la técnica son capaces de preparar disoluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. También pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario.

10 La composición también puede administrarse mediante microesferas, liposomas, otros sistemas de administración de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, que incluyen la sangre.

Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden utilizarse según la invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins, 20ª edición, ISBN 0-912734-04-3; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Ansel, H.C. *et al.*, 7ª edición, ISBN 0-683305-72-7.

15 La composición de la invención generalmente se administra a un sujeto en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta una cantidad suficiente para que el sujeto al cual se le administra la composición obtenga un beneficio. La dosis real administrada, y la velocidad y el tiempo de la administración, dependerán y pueden ser determinados tomando en consideración la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando, así como factores tales como la edad, el sexo y el peso del sujeto que se está tratando, así como la vía de administración. Además deben
20 considerarse las propiedades de la composición, por ejemplo, su actividad de unión y semivida plasmática, la concentración del anticuerpo o del miembro de unión en la formulación, así como la vía, el sitio y la velocidad de administración.

25 Los regímenes de dosificación pueden incluir una única administración de la composición, o múltiples dosis administradas de la composición. Las composiciones también pueden administrarse de modo secuencial o por separado con otros productos terapéuticos y medicamentos que se emplean para el tratamiento del trastorno por el cual el anticuerpo o miembro de unión de la presente invención está siendo administrado como tratamiento.

30 Los ejemplos de regímenes de dosificación que pueden administrarse a un sujeto pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita de 1 µg/kg/día a 20 mg/kg/día, de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, de 10 µg/kg/día a 1 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, la dosificación será tal que se obtiene una concentración plasmática de 1 µg/ml a 100 µg/ml del anticuerpo. Sin embargo, la dosis real de la composición administrada, y la velocidad y el tiempo de la administración, dependerán la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., en último término están dentro de la responsabilidad y el criterio del médico general y otros médicos, y generalmente se toma en cuenta el trastorno que se está tratando, la condición del paciente individual, el sitio de la administración, el método de la administración y
35 otros factores conocidos por los médicos.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que entienden habitualmente los expertos en la técnica del campo de la presente invención.

40 A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto exija lo contrario, se entenderá que los términos "comprende" o "incluye", o sus variaciones, tales como "que comprende" o "comprendiendo", "que incluye" o "incluyendo", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

45 Tal como se emplean en la presente, los términos tales como "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en singular y en plural, a menos que el contexto exija claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un agente activo" o "un agente farmacológicamente activo" incluye un único agente activo, así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que las referencias a "un vehículo" incluyen mezclas de dos o más vehículos, así como un único vehículo.

50 Las expresiones "se une específicamente", "se une selectivamente" o "especificidad de unión" se refieren a la capacidad de anticuerpos totalmente humanizados o compuestos de unión de la invención para unirse a un epitopo diana presente sobre un receptor de tipo Toll con mayor afinidad que la que resulta cuando se une a un epitopo que no es la diana. En ciertas realizaciones, la unión específica se refiere a la unión a una diana con una afinidad que es al menos 10, 50, 100, 250, 500 o 1000 veces mayor que la afinidad por un epitopo que no es la diana. En ciertas realizaciones, esta afinidad se determina mediante un ensayo de ELISA de afinidad. En ciertas realizaciones, la afinidad puede determinarse mediante un ensayo BIAcore. En ciertas realizaciones, la afinidad puede determinarse
55 mediante un método cinético. En ciertas realizaciones, la afinidad puede determinarse mediante un método de equilibrio/disolución.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de un agente, un compuesto de unión, una molécula pequeña, una proteína de fusión o un peptidomimético que se requiere para suprimir la inflamación mediada por TLR2 en el riñón o que reduce la gravedad y/o mejora una enfermedad renal mediada por TLR2 o al menos uno de sus síntomas o un trastorno asociado con ella.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una composición que se requiere para evitar la aparición inicial, la progresión o la recurrencia de una enfermedad mediada por TLR2 o un trastorno inflamatorio, o al menos uno de sus síntomas, en un sujeto después de la administración de los compuestos de la presente invención.

10 Tal como se emplea en la presente, el término “tratamiento” y los términos asociados, tales como “tratar” y “que trata” significan la reducción de la progresión, la gravedad y/o la duración de un trastorno mediado por TLR2, o al menos uno de sus síntomas, en el que dicha reducción o mejora resulta de la administración de un compuesto de unión de la presente invención. Por tanto, el término “tratamiento” se refiere a cualquier régimen que puede beneficiar a un sujeto. El tratamiento puede ser con respecto a un trastorno existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, mitigantes o profilácticos. Las referencias en la presente a tratamientos “terapéuticos” y “profilácticos” deben considerarse en su contexto más amplio. El término “terapéutico” no implica necesariamente que un sujeto se trata hasta su recuperación total. De forma similar, “profiláctico” no significa necesariamente que el sujeto no contraiga en algún momento un trastorno de enfermedad.

15 Tal como se emplea en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero y en particular un ser humano. En una realización particular, el sujeto es un mamífero, en particular un ser humano. El término “sujeto” es intercambiable con el término “paciente”, tal como se emplea en la presente.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción de un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado

25 Los anticuerpos antagonistas de TLR2 de la presente invención son generalmente anticuerpos totalmente humanizados. Es decir, los anticuerpos tienen un origen totalmente humano y, por tanto, no contienen regiones o combinaciones de aminoácidos derivadas de especies no humanas, tales como ratones.

30 Un método para producir los anticuerpos totalmente humanizados de la invención es mediante el uso de la tecnología de anticuerpos humanos de composición (Antitope, Reino Unido), según se describe en la solicitud de patente internacional PCT n.º WO 2006/082406. Estos anticuerpos son proteínas compuestas que comprenden 2 o más segmentos de secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpos humanos. Los segmentos pueden seleccionarse de modo que se evita la presencia de epitopos de células T en el anticuerpo final, por ejemplo, mediante la selección de los restos, en particular de las regiones variables de cadena ligera y pesada, para asegurarse de que no comprendan motivos de unión de MHC de clase II, o que no comprendan restos que anclen la unión de péptidos al MHC de clase II. Además, pueden emplearse métodos de simulación computacional para analizar las regiones variables del anticuerpo totalmente humanizado de la invención para asegurarse de que no estén presentes epitopos de células T.

35 En la producción de un anticuerpo totalmente humanizado utilizando la técnica de anticuerpos humanos compuestos, se obtiene un anticuerpo final que comprende una composición de muchos segmentos de secuencias, todos los cuales tienen un origen humano, y todos los cuales derivan de diferentes anticuerpos humanos. Brevemente, la técnica implica las etapas de analizar las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal de partida, por ejemplo, un anticuerpo murino o quimérico que presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 para identificar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Entonces se generan modelos de proteínas de las regiones variables del anticuerpo utilizando estructuras de anticuerpos existentes como molde, empleando Swiss PDB. Estos modelos estructurales después se analizan para identificar importantes aminoácidos “construyentes” en las regiones de dominio variable del anticuerpo original que es probable que sean fundamentales para las propiedades de unión del anticuerpo. Los restos contenidos dentro de las regiones CDR (según se definen utilizando las definiciones de Kabat y Chothia), junto con una serie de restos de marco, generalmente son importantes. La información estructural extraída a partir del modelo de proteína se emplea para identificar y comparar restos que son críticos para la confirmación del anticuerpo y la unión con restos estructuralmente equivalentes procedentes de estructuras de anticuerpos existentes y bases de datos de secuencias. Estos aminoácidos entonces pueden considerarse candidatos para la inclusión en uno o más variantes de las secuencias humanizadas finales. En la preparación del anticuerpo de la presente invención, se ha observado que ambas secuencias de VH y VK del anticuerpo anti-TLR2 murino en las que se basa el anticuerpo totalmente humanizado de la invención (anticuerpo de receptor de tipo Toll 2 (TLR2) de ratón, derivado del clon de hibridoma T2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, EEUU, n.º de catálogo 1054) contienen restos de marco típicos, en especial en el VH, en donde el anticuerpo tiene configuraciones de secuencias muy habituales en posiciones críticas, por ejemplo, restos de Kabat 45-49 (LEWIG) y 92-94 (CAR).

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera monoclonales de origen después se comparan con los correspondientes segmentos de secuencias de la región variable humana para identificar

secuencias humanas de cadena ligera y pesada potenciales para la posible inclusión en la secuencia humanizada final. Por último, se diseñan cadenas pesadas y ligeras totalmente humanizadas totalmente a partir de segmentos de secuencias de la región variable humana.

5 Se diseña y se produce el anticuerpo totalmente humanizado sintetizando, en primer lugar, los genes de la región VH y VK utilizando una serie de oligonucleótidos solapantes que son reasociados, acoplados y amplificados mediante PCR para producir regiones V sintéticas de longitud completa. La secuencia polinucleotídica después se clonó directamente en un vector de expresión adecuado, cuyos ejemplos conocerán los expertos en la técnica, tal como un sistema de vector de expresión que codifica un anticuerpo, tal como IgG. En el caso del vector de expresión utilizado para la producción del anticuerpo OPN-305 de la presente invención, el sistema de vector de expresión se refiere a una secuencia derivada de IgG4 que comprende una región de bisagra modificada (una sustitución S241P), así como cadenas pesadas y una cadena ligera kappa. Las cadenas pesada y ligera después se transfecan de forma estable en células NS0 mediante electroporación y se seleccionan utilizando metotrexato 200 nM (Sigma, n.º de catálogo M8407). Las colonias resistentes a metotrexato se ensayan para los niveles de expresión de IgG.

15 Aunque se utilizaron células NS0, puede emplearse cualquier línea celular adecuada conocida por los expertos en la técnica. En particular, se prefiere el uso de células de mamífero dentro de un cultivo de células de mamífero como plataforma para la producción de los anticuerpos y los fragmentos de unión de la invención. El uso de células de mamífero es particularmente preferido, debido al perfil de N-glicosilación que se aplica a la proteína, puesto que dichos perfiles de glicosilación son similares a los que se encuentran en las proteínas humanas. Las líneas celulares que generalmente se emplean para el cultivo de células de mamífero incluyen células CHO, células de hibridoma NS0, células de riñón de cría de hámster (BHK), y células humanas PER.C6™. Las líneas de células de mamífero que se emplean más habitualmente para el cultivo de células de mamífero a volúmenes de escala de producción son las líneas de células CHO y NS0. Estos tipos de células son relativamente fáciles de cultivar a gran escala y pueden excretar altas titulaciones de proteínas recombinantes en disolución. Ambas líneas de células CHO y NS0 pueden producir altos niveles de expresión de proteínas.

Además de las plataformas de expresión de proteínas basadas en células de mamífero, también se pueden utilizar sistemas de expresión basados en plantas o sistemas de animales transgénicos para la producción de las proteínas de la invención.

30 Los anticuerpos compuestos después se purifican a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares sobre una columna de Sepharose A-proteína A (GE Healthcare, n.º de catálogo 110034-93) y se cuantifican mediante DO280 nm, utilizando un coeficiente de extinción calculado, en el que $E_{c}(0,1\%) = 1,43$. Después los anticuerpos purificados se ensayan en un ensayo de competición de ELISA para confirmar la unión al receptor de tipo Toll 2. Esta unión puede compararse con la unión a un anticuerpo de referencia, tal como una forma biotinilada de un anticuerpo de unión al receptor de tipo Toll 2 en el que se basó el anticuerpo totalmente humano. En particular, la absorbancia del ensayo de competición de ELISA puede representarse gráficamente frente a la concentración de muestra y ajustarse líneas rectas a través de cada uno de los conjuntos de datos relacionados con el anticuerpo biotinilado original y totalmente humano. Las ecuaciones de las líneas se emplearon para calcular la concentración requerida para inhibir la unión del anticuerpo de referencia biotinilado al TLR2 en 50% (denominado valor de CI50). Entonces, el valor de la CI50 puede utilizarse para calcular la diferencia en número de veces de la eficacia de unión. La eficacia de unión determinada puede ser una importante determinación de la especificidad del anticuerpo totalmente humanizado que se produce. También pueden realizarse otras comparaciones, por ejemplo, comparar el anticuerpo totalmente humanizado con un anticuerpo quimérico o murino, que tenga especificidad de unión por el mismo antígeno.

Ejemplo 2 - Determinación de las propiedades de unión del anticuerpo monoclonal OPN-305

45 El inventor ha descubierto, de forma sorprendente, que el anticuerpo monoclonal murino antagonista de TLR2 T2.5 requiere la unión a CD32 para antagonizar totalmente la función del receptor de tipo Toll 2. Por tanto, se realizaron experimentos para confirmar que esta limitación funcional asociada con el uso del anticuerpo T2.5 no está también asociada con el uso del anticuerpo monoclonal OPN-305 para mediar en su efecto de neutralizar la actividad biológica del receptor de tipo Toll 2.

Materiales y métodos

50 Las células THP-1 son células monocíticas de sangre periférica humanas. En respuesta a los ligandos del receptor de tipo Toll se activa el factor de transcripción NF-kappaB y otros factores de la transcripción en las células THP1. La línea celular THP-1 Blue ha sido transfectada de forma estable con un plásmido indicador que codifica el gen de la fosfatasa alcalina embrionaria segregada (SEAP) bajo el control de un promotor inducible por varios factores de la transcripción, tales como NF-kappaB y AP-1. El variante de la línea celular THP-1 CD14 Blue sobreexpresa la proteína de la superficie celular CD14 para potenciar la sensibilidad. Las células THP-1 CD14 Blue resultantes son resistentes a los marcadores seleccionables zeocina y blastidina. Tras la estimulación de TLR, las células THP-1 Blue activan factores de transcripción y después la secreción de SEAP, que entonces se convierte en detectable utilizando el sistema indicador QUANTI-Blue. QUANTI-Blue es un ensayo enzimático colorimétrico desarrollado para determinar la actividad fosfatasa alcalina segregada (SEAP) en los sobrenadantes de cultivos celulares. En

presencia de SEAP, el medio de QUANTI-Blue cambia a un color morado-azul que puede detectarse con facilidad a simple vista, o puede cuantificarse leyendo la densidad óptica (DO) a 625-655 nm.

Las células THP-1 CD14 Blue se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-TLR2 OPN-305 (1 µg/ml) premezclado con el anticuerpo anti-CD32a (RnD n.º AF1875) o con el anticuerpo anti-CD32b (RnD n.º AF1330) o con IgG de cabra en el intervalo de 5 µg/ml-0,18 µg/ml durante 5 minutos a 37 °C antes de la estimulación con 20 ng/ml del agonista de TLR1/TLR2 Pam3CSK4. El anticuerpo monoclonal OPN-305 es un anticuerpo totalmente humanizado que tiene la cadena ligera definida en la presente como SEQ ID NO:2 y una cadena pesada definida en la presente en SEQ ID NO:5.

Las células después se incubaron durante la noche a 37 °C. Los sobrenadantes después se retiraron y se inactivaron con calor antes de la adición de QUANTI-Blue (Invivogen, San Diego, EEUU). Se midieron los cambios colorimétricos que representan la activación de NF-κB a 650 nm utilizando un luminómetro.

Los resultados se muestran en la figura 9. Estos resultados indican que la actividad funcional de OPN-305 como antagonista del receptor de tipo Toll 2 no se ve bloqueada por la adición de anticuerpos anti-CD32a/b. Por tanto, esto indica que la actividad neutralizante del receptor de tipo Toll 2 mediada por OPN-305 no depende de la unión a CD32a o CD32b.

Ejemplo 3 - Papel de CD32 en el antagonismo del receptor de tipo Toll 2

Los resultados del ejemplo 2 sugieren que el antagonismo del receptor de tipo Toll 2 por el anticuerpo totalmente humanizado de la invención OPN-305 no depende de que el anticuerpo se una a CD32 (tanto a CD32a como a CD32b).

Para confirmar esto y para proporcionar una comparación con otros anticuerpos antagonistas de TLR2 que se conocen en la técnica, tales como el anticuerpo monoclonal de TLR2 murino T2.5 (OPN-301), se realizó una serie de experimentos.

Materiales y métodos

Células THP-1 CD14 Blue (Invivogen, San Diego, EEUU) se preincubaron con dosis de anticuerpos que bloquean CD32a o CD32b.

Las células THP-1 CD14 Blue preincubadas se incubaron con dosis crecientes de (i) un anticuerpo anti-FcγRIIIa humano (CD32a) (R&D Systems, n.º de catálogo AF1875, tal como se emplea en el ejemplo previo), (ii) un anticuerpo anti-FcγRIII humano (CD32) (R&D Systems, n.º de catálogo AF1330), o (iii) un anticuerpo de control de isotipo (IgG de cabra, R&D Systems, n.º de catálogo AB-108-C). Así, a las células se les añadieron 200 ng/ml del anticuerpo anti-TLR2 murino T2.5 (OPN-301) o el anticuerpo OPN-305 totalmente humanizado. Las células después se estimularon con 100 ng/ml del agonista de TLR2 Pam3CSK4 (Invivogen) durante la noche.

Resultados

Se midió la producción de SEAP dependiente de NF-κB en sobrenadantes celulares. La figura 10A muestra los resultados para las células expuestas a OPN-301 (anticuerpo anti-TLR2 murino T2.5). La figura 10B muestra los resultados para las células expuestas al anticuerpo antagonista de TLR2 totalmente humanizado OPN-305. En la figura 10A, la columna A se refiere a las células estimuladas solo con Pam3CSK4. La columna B se refiere a las células expuestas al anticuerpo OPN-301. La columna C se refiere al anticuerpo OPN301 junto con 0,4 µg/ml de anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control. La columna D se refiere al anticuerpo OPN301 junto con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control. La columna E se refiere al anticuerpo OPN301 más 10 µg/ml de anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control.

En la figura 10B, la columna A se refiere a células estimuladas solo con Pam3CSK4. La columna B se refiere a células expuestas al anticuerpo OPN-305. La columna C se refiere al anticuerpo OPN305 junto con 0,4 µg/ml de anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control. La columna D se refiere al anticuerpo OPN305 junto con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control. La columna E se refiere al anticuerpo OPN305 más 10 µg/ml de anti-CD32a/b o un anticuerpo IgG de cabra control.

La comparación de los datos que aparecen en las dos figuras demuestra claramente que el antagonismo de TLR2 que es mediado por OPN-305 no depende de que el anticuerpo interactúe con CD32, puesto que el bloqueo de CD32 con un anticuerpo específico de CD32a o CD32 no produce ningún efecto sobre la capacidad neutralizante de TLR2 de OPN305. Por contraste, el anticuerpo T2.5 murino (OPN-301) demuestra ser dependiente de la unión a CD32 para mediar en la completa neutralización de la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, el inventor predice, por tanto, que, en la mediación en el antagonismo del TLR2, el anticuerpo OPN-301 se une al TLR2 y también a CD32, y esta interacción con CD32 es necesaria para mediar en el antagonismo del receptor de tipo Toll 2. Por tanto, existe una diferencia funcional entre el mecanismo de acción utilizado por el anticuerpo OPN-305 y el anticuerpo OPN-301 con relación al antagonismo de la actividad

funcional del receptor de tipo Toll 2. Por tanto, la actividad antagonista de TLR2 de OPN-301 puede ser bloqueada mediante el bloqueo de la unión a CD32. Sin embargo, el bloqueo de la capacidad de OPN-305 para unirse a CD32, CD32a O CD32b no afecta a su capacidad para antagonizar la actividad funcional del receptor de tipo Toll 2.

Ejemplo 4 - Confirmación de la especificidad de unión al receptor de tipo Toll 2 de OPN-305

5 El experimento se diseñó para confirmar que el anticuerpo monoclonal de la invención OPN-305 muestra especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 y, en particular, por el receptor de tipo Toll 2 humano.

Materiales y métodos

10 Células HEK 293 (riñón embrionario humano 293) transfectadas de forma estable con el receptor de tipo Toll 1 y el receptor de tipo Toll 2 para permitir la formación de un heterodímero de TLR1/TLR2 se incubaron con 1,0 µg/ml de una forma biotinilada del anticuerpo anti-TLR2 murino OPN-301 (T2.5) solo o en presencia de 1,0 µg o 10 µg/ml del anticuerpo anti-TLR2 totalmente humanizado OPN-305 o un anticuerpo control de isotipo IgG4 OPN-305 durante 30 minutos en hielo.

El anticuerpo monoclonal OPN-301 es un anticuerpo anti-TLR2 IgG1 murino (anticuerpo del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) de ratón, clon T2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, EEUU, n.º de catálogo 1054).

15 El anticuerpo monoclonal OPN-305 es un anticuerpo totalmente humano que tiene la cadena ligera definida en la presente como SEQ ID NO:2 y una cadena pesada definida en la presente en SEQ ID NO:5.

Las células después se lavaron y se incubaron con estreptavidina conjugada con PECy7 durante 30 minutos más. La unión se midió utilizando FACScalibur (Becton Dickinson). Los resultados se muestran en la figura 11.

20 La figura 11A se refiere a la unión de OPN-305 (marcado como variante 21). Empezando desde la izquierda hacia la derecha, la línea más oscura del primer pico se refiere a la línea roja. La línea más clara en el primer pico se refiere a la línea verde. En dirección a la derecha, el tercer, cuarto y quinto pico son los picos morados, azul y negro, respectivamente. La unión de OPN-305 fue demostrada mediante un desplazamiento hacia la izquierda de los histogramas azul y morado (que representan OPN-301 y OPN-305), comparado con OPN-301 solo (histogramas negros) que demuestran que OPN-305 está compitiendo con OPN-301 por la unión al TLR2 humano sobre las células HEK. En conclusión, la figura 11A muestra un desplazamiento de los picos dependiente de la dosis, que indica una competición en la unión entre OPN-301 y OPN-305 para el receptor de tipo Toll 2 humano.

25 La figura 11B muestra los resultados de la unión con el control de isotipo IgG4. Puesto que el anticuerpo de control de isotipo IgG4 no presenta especificidad de unión por TLR2, no compete por la unión. Por tanto, no se produce un desplazamiento en los picos negro, morado o azul, que se agrupan y están representados como el segundo pico, tal como se muestra en la zona derecha de la figura 11B. El pico en la zona izquierda se refiere al pico rojo (línea más oscura) y el pico verde (línea más clara). Por tanto, estos resultados confirman que OPN-305 presenta especificidad de unión por el receptor de tipo Toll 2 humano.

Ejemplo 5 - Reactividad cruzada de OPN-305 con el receptor de tipo Toll 2 murino

35 Habiendo determinado en el ejemplo 4 que OPN-305 muestra especificidad de unión con el receptor de tipo Toll 2 humano, este experimento evalúa si el anticuerpo monoclonal OPN-305 muestra reactividad cruzada intraespecífica con respecto al receptor de tipo Toll 2, que permitiría unirse a OPN-305 a otras formas de receptores de tipo Toll 2 de mamífero, tales como el receptor de tipo Toll 2 murino.

Materiales y métodos

40 Se cultivaron macrófagos de ratón J774 a 1×10^6 /ml en presencia de 5 µg/ml de OPN-305 (denominado OPN-305-21), OPN-301 (T2.5) o el anticuerpo de control de isotipo pertinente (IgG1 murina para OPN-301 e IgG4 humana para OPN-305) durante 6 horas a 37 °C. Las células se expusieron al agonista de TLR2 HKLM (Invivogen, San Diego, EEUU, n.º de catálogo tir-kit2). HKLM es una preparación inactivada por calor liofilizada de *Listeria monocytogenes* (LM), una bacteria gram-positiva intracelular facultativa. Los sobrenadantes después se retiraron y se midieron los niveles de TNF-α murino mediante ELISA DouSet específica de RnD Systems (R&D Systems).

Resultados

Los resultados se muestran en la gráfica de la figura 12. Esta demuestra que OPN-305 suprime las respuestas de TLR2 murino de una manera a grandes rasgos similar a la inhibición de OPN-301. Por consiguiente, OPN-305 presenta reactividad cruzada porque se une al receptor de tipo Toll 2 expresado sobre la superficie de células murinas.

50 En conclusión, se ha demostrado que OPN-305 suprime la secreción de TNF-α desde macrófagos J774 murinos que fueron estimulados con un agonista de TLR2.

Ejemplo 6 - Reactividad cruzada de OPN-305 con el receptor de tipo Toll 2 de mono

Se realizaron más experimentos para determinar la especificidad de unión de OPN-305 por el receptor de tipo Toll 2 expresado sobre células de mono. Estos determinarán si el anticuerpo OPN-305 presenta reactividad cruzada con una variedad más amplia de formas de mamífero del receptor de tipo Toll 2, no tan solo las formas humana y murina.

Se determinó la unión de OPN-305 al receptor de tipo Toll 2 de mono mediante un ensayo de anticuerpos directo y un ensayo de unión de competición.

(i) Unión directa

Se incubaron células sanguíneas completas de monos cynomolgus con 1,0 µg/ml de OPN-305 o un anticuerpo de control de isotipo IgG4 durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se incubaron con PharmLyse (BD Biosciences) para lisar los eritrocitos sanguíneos, seguido de una detección con anti-IgG4 humana marcado con FITC.

Los resultados se muestran en las figuras 13A, B y C. Los diferentes tipos de células se clasificaron según sus características de dispersión directa y lateral. La figura 13A se refiere a los granulocitos. La figura 13B se refiere a los monocitos. La figura 13C se refiere a los linfocitos. La unión se demostró mediante un desplazamiento del histograma hacia la derecha de las células incubadas con OPN-305 (histograma azul - es el pico en la zona derecha del grupo de picos) comparado con las células incubadas con el anticuerpo de control de isotipo (histograma verde - es el segundo pico, desplazándose desde la izquierda hacia la derecha, teniendo este pico un color más claro). Los resultados en las figuras 13A y 13B demuestran que el pico azul se ha movido más hacia la derecha que el pico verde. Esto demuestra que OPN-305 se une al TLR2 de mono que se expresa sobre granulocitos y monocitos. Por tanto, OPN-305 muestra una reactividad cruzada más amplia con respecto al receptor de tipo Toll 2 expresado sobre diferentes tipos celulares.

(ii) Ensayo de competición

Se incubaron células sanguíneas completas de monos cynomolgus con 1,0 µg/ml de OPN-301 biotinilado solo o en presencia de 1,0 µg o 10 µg/ml de OPN-305 o un anticuerpo de control de isotipo IgG4 (para OPN305) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células después se lavaron y se incubaron con estreptavidina conjugada con Pcy7 durante 30 minutos más.

El anticuerpo monoclonal OPN-301 es un anticuerpo anti-TLR2 IgG1 murino (anticuerpo de receptor de tipo Toll 2 (TLR2) de ratón, clon T2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, EEUU, n.º de catálogo 1054).

El anticuerpo monoclonal OPN-305 es un anticuerpo totalmente humano que tiene la cadena ligera definida en la presente como SEQ ID NO:2 y una cadena pesada definida en la presente en SEQ ID NO:5.

La unión se midió utilizando FACScalibur de Becton Dickinson. Los resultados se muestran en las figuras 14A, B y C. La figura 14A se refiere a los granulocitos. La figura 14B se refiere a los monocitos. La figura 14C se refiere a los linfocitos. La unión de OPN-305 se demuestra mediante un desplazamiento hacia la izquierda de los histogramas verdes (que representan OPN-301+OPN-305) comparado con OPN-301 solo (histogramas negros) que demuestra que OPN-305 está compitiendo con OPN-301 por la unión al TLR2 de mono. Por consiguiente, de nuevo puede observarse que OPN305 está compitiendo por la unión al receptor de tipo Toll 2 de mono. Esto también confirma que OPN-305 presenta reactividad cruzada con el receptor de tipo Toll 2 expresado sobre células humanas, de ratón o de mono.

Ejemplo 7 - Inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal OPN-305

Se realizó el análisis del anticuerpo OPN-305 para determinar la presencia de epitopos inmunogénicos que puedan dar lugar a que se genere una respuesta inmunológica, tal como una respuesta HAMA, contra el anticuerpo por parte del sujeto al cual se administra el anticuerpo. Tal como se analizó anteriormente en la presente, la presencia de epitopos de células T es muy indeseable, puesto que la producción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo daría lugar a que el anticuerpo ya no sea adecuado para la administración a un paciente con fines terapéuticos. Por tanto, se analizó el anticuerpo OPN-305 para asegurarse de que ningún epitopo de células T estuviese evidentemente presente.

Materiales y métodosPreparación y selección de PMBC donantes

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la capa leucocítica de donantes sanos residentes (de sangre extraída en las últimas 24 horas) obtenida de the National Blood Transfusion Service (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido). Las PBMC se aislaron a partir de la capa leucocítica mediante una centrifugación de densidad LYMPHOPREP™ (Axis-Shield, Dundee, Reino Unido) y se disminuyó la cantidad de

5 las células T CD8+ utilizando ROSETTESEP™ de CD8+ (StemCell Technologies Inc., Londres, Reino Unido). Los donantes se caracterizaron identificando los haplotipos HLA-DR utilizando un kit de tipificación de tejidos basado en PCR-SSP Biotest (Biotest, Landsteinerstraße, Dinamarca), así como determinando las respuestas de células T a un antígeno control de hemocianina de lapa (KLH) (Pierce, Rockford, EEUU). Después las PBMC se congelaron y se conservaron en nitrógeno líquido hasta que fueron necesarias.

Se seleccionó una cohorte de 21 donantes para representar mejor el número y la frecuencia de los alotipos HLA-DR expresados en la población mundial. El análisis de los alotipos expresados en la cohorte contra los expresados en la población mundial reveló que se logró una cobertura >80% y que todos los principales alelos HLA-DR (alotipos individuales con una frecuencia >5% expresados en la población mundial) estaban bien representados.

10 Ensayos de proliferación de células T de desarrollo en el tiempo EpiScreen

15 El anticuerpo se sometió a un análisis para determinar la presencia de epitopos de células T tal como se indica en la solicitud de patente internacional n.º WO 2007/099341. Las PBMC de cada donante se descongelaron, se contaron y se evaluó la viabilidad. Las células se revivieron en medio de cultivo AIMV a temperatura ambiente (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y se resuspendieron en AIMV hasta $4,6 \times 10^6$ PBMC/ml. Para cada donante se establecieron cultivos madre a los que se añadió un total de 1 ml de cultivo madre de células de proliferación a una placa de 24 pocillos. Un total de 1 ml de cada muestra de ensayo diluida se añadió a las PBMC para producir una concentración final de 50 µg/ml por muestra. Para cada donante también se incluyó un control positivo (células incubadas con 100 µg/ml de KLH) y un control negativo (células incubadas solo con medio de cultivo). Para los primeros 4 donantes, se incluyó otro control para ensayar la modulación de las respuestas de células T por las muestras de ensayo, en el que la muestra de ensayo y KLH se añadieron a las PBMC. La comparación de estas muestras con KLH sola puede utilizarse para evaluar los efectos de las muestras de ensayo sobre la proliferación. Los cultivos se incubaron durante un total de 8 días a 37 °C con CO₂ al 5%. En los días 5, 6, 7 y 8, las células en cada pocillo se resuspendieron cuidadosamente y se trasladaron partes alícuotas de 3 x 100 µl a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Los cultivos se pulsaron con 1 µCi de [3H]-timidina (Perkin Elmer™, Waltham, Massachusetts, EEUU) en 100 µl de medio de cultivo AIMV y se incubaron durante 18 horas más antes de recolectar sobre esterillas de filtro (Perkin Elmer™, Waltham, Massachusetts, EEUU) utilizando un recolector de células TomTec Mach III. Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) para cada pocillo mediante recuento de centelleo MELTILEX™ (Perkin Elmer™, Waltham, Massachusetts, EEUU) sobre un contador beta de microplacas en modo de recuento de bajo fondo, paralux. Para evaluar la toxicidad potencial de las muestras de ensayo se realizaron recuentos de viabilidad celular (utilizando un contador VICELL™ y exclusión de tinte de azul de tripano) sobre las muestras de los cultivos de ensayo y los controles de medio y KLH para los primeros 10 donantes después de 7 días de incubación.

Análisis de los datos de EpiScreen

35 Para los ensayos de proliferación, se hubo establecido previamente un umbral empírico de un índice de estimulación (IE) mayor o igual a 2 ($IE \geq 2$), por el cual las muestras que inducen respuestas proliferativas por encima de este umbral se consideran positivas (cuando se incluyen, se destacan los valores límite de $IE \geq 1,95$). Un extenso desarrollo de ensayos y estudios previos han demostrado que este es el umbral mínimo de señal a ruido que permite la máxima sensibilidad sin detectar un número elevado de respuestas falsas positivas. Para los conjuntos de datos de proliferación ($n = 3$), las respuestas positivas se definen por los umbrales estadístico y empírico:

40 - significancia ($p < 0,05$) de la respuesta comparando las cpm de los pocillos de ensayo con los pocillos de control de medio utilizando un ensayo de la t de Student de dos muestras desapareado,

- índice de estimulación mayor que 2 ($IE \geq 2$), en el que $IE = \text{media de los pocillos de ensayo (cpm)}/\text{media de los pocillos de control de medio (cpm)}$.

45 Además, se evaluó la variación intraensayo calculando el coeficiente de varianza y la desviación estándar (DE) de los datos brutos de cultivos duplicados.

Resultados

El anticuerpo anti-TLR2 OPN-305 (VK5/VH4) se purificó hasta la homogeneidad mediante una cromatografía de afinidad de proteína A, seguida de una cromatografía de exclusión molecular.

50 El variante denominado VK5/VH4 es el anticuerpo monoclonal totalmente humanizado OPN-305 descrito en la presente. El anticuerpo monoclonal OPN-305 es un anticuerpo totalmente humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena ligera definida en la presente como SEQ ID NO:2 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada definida en la presente en SEQ ID NO:5.

Todas las preparaciones se derivaron de picos individualse que representan el anticuerpo no agregado monomérico (figuras 15A y B) y se descubrió que contenían endotoxinas a < 5 EU/mg.

Las tres muestras de ensayo se ensayaron contra una cohorte de 21 donantes sanos empleando los ensayos de células T de desarrollo en el tiempo EpiScreen™ (Antitope, Reino Unido) para determinar el riesgo relativo de inmunogenicidad. Las muestras se ensayaron a una concentración final de 50 µg/ml, puesto que esta cantidad proporciona una concentración saturante que es suficiente para estimular respuestas de células T específicas de proteínas detectables.

Se analizaron los resultados de la modulación de células T y los estudios de toxicidad celular. Las viabilidades celulares en los cultivos después de siete días varían del 65% al 95%, y son similares entre todas las muestras de ensayo, el control de medio y el control de KLH. Por tanto, se consideró que las muestras de ensayo no tenían un efecto tóxico sobre las células utilizadas en el ensayo. Además, la figura 16 demuestra que no existen diferencias significativas (ensayo de la t de Student $p < 0,05$) entre los IE inducidos por KLH solo o en presencia de las muestras de ensayo. Esto sugiere que las muestras de ensayo no modulan directamente la activación de células T CD4+ en respuesta a KLH (antígeno control). La figura 16 muestra los resultados de una preselección de muestras de ensayo para la citotoxicidad y la actividad de modulación de células T. La muestra 1 es un anti-TLR2 quimérico (el fragmento F'ab derivado del anticuerpo murino T2.5 conjugado con la región Fc de la IgG4 humana), la muestra 2 es el anticuerpo anti-TLR2 OPN-305 (VK5/VH4, OPN305), la muestra 3 es un anticuerpo anti-TLR2 variante denominado VK5/VH5.

Los resultados del ensayo de proliferación de desarrollo en el tiempo EpiScreen™ realizados con los anticuerpos anti-receptor de tipo Toll 2 OPN-305 (VK5/VH4, OPN-305) y VK5/VH5 comparativo, así como con los anticuerpos quiméricos anti-TLR2 se analizaron (figura 17A, B y C). El anticuerpo anti-TLR2 quimérico estimula respuestas en 4 de los 21 donantes (18% de la cohorte de estudio) cuando se logra $IE \geq 2$ y la significancia en el ensayo de la t de Student ($p < 0,05$). El donante 20 ofreció una respuesta particularmente vigorosa con altos IE a lo largo del periodo de ensayo, y también se observó una fuerte respuesta ($IE = 6,99$) con el donante 3 en el día 6. Por contraste, ninguno de los donantes en la cohorte de estudio respondió positivamente a OPN-305. Por tanto, el anticuerpo OPN-305 (VK5/VH4) no produjo respuestas de células T significativas en los donantes que respondieron positivamente al anticuerpo quimérico.

Conclusiones

Las respuestas de proliferación de células T CD4+ positivas observadas en el ensayo de células T de desarrollo en el tiempo EpiScreen™ contra el anticuerpo quimérico estuvieron en el intervalo esperado del 15-40%. De forma importante, se observaron respuestas de células T frecuentes y potentes contra el antígeno control, KLH, que indican que el ensayo funcionó tal como se esperaba. Los resultados también demuestran que el anticuerpo totalmente humanizado OPN-305 (VK5/VK4) no indujo respuestas inmunológicas positivas en ninguno de los donantes y, por tanto, se considera que este anticuerpo tiene un riesgo bajo de inmunogenicidad en la clínica.

La figura 18 demuestra una clara correlación entre el nivel de inmunogenicidad observado utilizando el ensayo EpiScreen™ y el nivel de inmunogenicidad (respuestas de anticuerpos terapéuticos antiproteína) que se ha observado realmente en la clínica contra un gran panel de proteínas terapéuticas (Baker y Jones, 2007). Se observaron altos niveles de inmunogenicidad en los datos clínicos y en los ensayos EpiScreen™ para proteínas tales como infliximab y campath, mientras que se observaron unos niveles de inmunogenicidad relativamente bajos para proteínas tales como xolair, herceptina y avastina. De manera importante, el anticuerpo OPN-305 induce respuestas en <10% de la cohorte de estudio, lo cual, basándose en experiencias previas, está asociado con productos bioterapéuticos con un riesgo bajo de inmunogenicidad.

Ejemplo 8 - Determinación y comparación de la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal OPN-305

Los biosensores inmunológicos, por ejemplo los instrumentos de resonancia de plasmón de superficie (SPR) BIACORE™ que miden la unión y la disociación de los complejos de antígeno-anticuerpo a tiempo real, permiten aclarar la cinética de unión. La velocidad de disociación de un compuesto y su posterior optimización es especialmente importante para el desarrollo de anticuerpos biofarmacéuticos. BIACORE emplea la resonancia de plasmón de superficie (SPR) para controlar la interacción entre una molécula unida a la superficie ("ligando"), y su compañero de unión en disolución ("analito") a tiempo real. La SPR es un fenómeno de ondas de densidad-carga electrónica que surge en la superficie de una capa metálica cuando la luz se refleja en la capa bajo condiciones de reflectancia interna total. Los plasmones de superficie que se generan son sensibles a cualquier cambio en el índice de refracción del medio en el lado opuesto de la capa metálica de la luz reflejada. Las interacciones proteína-proteína que se producen en la superficie afectan al índice de refracción del medio y, por tanto, pueden detectarse. La unión de moléculas a la superficie del sensor modificada con el ligando genera una respuesta, que es proporcional a la masa unida, lo cual permite detectar pequeños cambios en la cantidad del analito unido (niveles hasta de pocos picogramos). La técnica puede utilizarse para medir constantes de afinidad (KD) a lo largo del intervalo de 10^{-5} a 10^{-12} M, las constantes de velocidad de asociación (k_a) entre 103 y 107 M-1s-1, y las constantes de velocidad de disociación (k_d) entre 10^{-1} y 10^{-6} s⁻¹ (1-3).

El objetivo de este estudio es utilizar el instrumento de resonancia de plasmón de superficie BIACORE T100 (Biacore, Inc.) para la caracterización cinética de alta resolución de la interacción entre dos receptores relacionados y tres mAb. Los dos receptores investigados fueron rhTLR-2 recombinante (TLR-2 humano recombinante) y

rmTLR2/Fc (TLR-2 murino recombinante).

Materiales y métodos

Preparación del instrumento

5 Antes de ensayar cualquier muestra se realizó una comprobación del sistema (kit Biacore Preventive Maintenance Kit 2). Todos los sistemas ensayados aprobaron la prueba (bomba de reactivo, refractómetro, inyecciones, ruido, mezclado y selector de tampón), lo cual indica el instrumento funcionaba según los criterios asignados por el fabricante. Después de comprobar el sistema se ejecutó el programa Desorber/Sanear (kit Biacore Preventive Maintenance Kit 2) para limpiar el instrumento.

Desarrollo del ensayo

10 Preparación del sistema

Tras la inserción del chip CM5 el sistema se cebó y después se normalizó con una disolución de normalización BIA (kit Biacore Preventive Maintenance Kit 2). Todas las muestras se ensayaron a 25 °C con un rejilla de muestras incubada a 25 °C a menos que se indique lo contrario. El chip se añadió al sistema con HBS-EP como tampón de ensayo. La superficie del chip se cebó con dos inyecciones de 30 segundos de NaOH 50 mM, y después se dejó en reposo hasta que se obtuvo una línea de base estable en todas las células de flujo (Fc).

Preparación de las muestras

20 Se analizaron dos anticuerpos, el anticuerpo anti-receptor de tipo Toll 2 OPN-305, según se describe en la presente, y el anticuerpo anti-receptor de tipo Toll 2 murino T2.5 (derivado del clon de hibridoma T2.5, HyCult Biotechnology b.v., Cell Sciences, Canton, EEUU, n.º de catálogo 1054). Ambos anticuerpos monoclonales se conservaron tal como fueron suministrados y se diluyeron hasta 1 µg.ml-1 para todos los ensayos de inmovilización. Los receptores rhTLR-2 y rmTLR2/Fc se reconstituyeron a partir del polvo seco utilizando HBS-EP hasta una concentración final de 1000 nM y se conservaron a 4 °C. No se añadió proteína vehículo a esta disolución.

Condiciones de inmovilización y actividad

25 Se eligió un ensayo directo para este estudio basándose en los resultados de un estudio previo, en el que se demostró que este conjunto es óptimo. Para los experimentos cinéticos, la cantidad de ligando inmovilizado debe limitarse para evitar los efectos de transferencia de masa en la superficie del chip.

Utilizando un PM medio de 77,5 kDa para el analito del receptor humano glicosilado (rhTLR-2), 150 kD para el ligando (mAb) y la estequiometría (Sm) de 2, una cantidad diana ideal de ligando para inmovilizar sería 145 RU. Este nivel de inmovilización también es adecuado para el receptor murino, aunque tenía un PM de 98 kDa.

30 Todos los anticuerpos se inmovilizaron utilizando la química de acoplamiento de aminas convencional. La inmovilización se realizó a una concentración de proteína de aproximadamente 1 µg.ml-1 en tampón acetato 10 mM, pH 5,5, hasta un nivel de respuesta diana de 150 RU en tres chips sensores CM5 serie S. Los datos cinéticos se obtuvieron a un caudal de 40 µg.ml-1 para minimizar cualquier efecto de transferencia de masas potencial. El blanco (sin receptor) y una única concentración de los analitos (100 nM) se repitieron al inicio de los ensayos cinéticos para comprobar la estabilidad de la superficie y de los dos receptores a lo largo de los análisis cinéticos. Se realizaron dos repeticiones de los análisis cinéticos y se compararon los resultados.

Para observar una disminución de señal suficiente (3-10%) durante la fase de disociación de los ciclos cinéticos, se midió la disociación durante 2000 segundos.

Resultados

40 Los resultados aparecen en la tabla 1. Se midieron las velocidades de asociación (K_{on}) y las velocidades de disociación (K_{off}) utilizando un modelo de unión bivalente (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2). La constante de equilibrio de disociación (K_o) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} .

Tabla 1

Anticuerpo	TLR2 murino			TLR2 humano		
	ON	OFF	Kd (M)	ON	OFF	Kd (M)
	Kd (1/Ms)	Kd (1/s)		Kd (1/Ms)	Kd (1/s)	
T2.5	9703	0,000141	$1,56 \times 10^{-8}$	4819	0,000230	$4,82 \times 10^{-8}$

Anticuerpo	TLR2 murino			TLR2 humano		
	ON	OFF	Kd (M)	ON	OFF	Kd (M)
	Kd (1/Ms)	Kd (1/s)		Kd (1/Ms)	Kd (1/s)	
OPN-305	6772	0,000082	$1,19 \times 10^{-8}$	3098	0,0000895	$2,89 \times 10^{-8}$

Los resultados indican que OPN-305 se une al receptor de tipo Toll 2 humano y al receptor de tipo Toll 2 murino con una afinidad de unión mayor que el anticuerpo monoclonal T2.5. La figura 19 muestra un alineamiento que indica la identidad de secuencia entre las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TLR2 totalmente humanizado OPN-305 y el anticuerpo anti-TLR2 murino T2.5. Puede observarse una divergencia de identidad de secuencia mayor que 10%. Además, la figura 20 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 totalmente humanizado OPN-305 y el anticuerpo anti-TLR2 murino T2.5. De nuevo está presente una divergencia de identidad de la secuencia mayor que 10%. Aunque no se pretende limitación alguna por la teoría, el inventor predice que las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del anticuerpo OPN-305, frente al anticuerpo murino T2.5, confieren una mayor especificidad de unión y afinidad al anticuerpo OPN-305 por el receptor de tipo Toll 2.

Ejemplo 9 - Estudios de ocupación del receptor TLR2

Este experimento se diseñó para identificar los niveles de ocupación mínimos requeridos para la inhibición de la actividad biológica del anticuerpo monoclonal OPN-305 cuando se une a TLR2. Se estudió la unión frente a la función utilizando una línea celular indicadora THP-1. En particular, se evaluó la bioactividad de OPN-305 en células THP1-CD14 inducidas por Pam3CSK4.

Materiales y métodos

Se sembraron células THP1-CD14 a una densidad de 1×10^6 células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Se añadió OPN-305 a los pocillos a diversas concentraciones (que varían de 0,000488 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$) antes de la adición de Pam3CSK4 (200 ng/ml). Las células se incubaron durante la noche a 37 °C. Se midió la actividad SEAP controlada por NF- κ B incubando el medio condicionado inactivado con calor con 160 μl de reactivo Quantibblue (Invivogen) durante 90 minutos a 37 °C y se leyó la absorbancia a 650 nm.

Para determinar la ocupación de los receptores de OPN305 en células THP1-CD14, las células THP1-CD14 Blue se colocaron en tubos FACS (1×10^6 /tubo) y se bloquearon los FcR con reactivo de bloqueo anti-CD32 (Mitenyl Biotec) durante 15 minutos. Las células se marcaron con OPN-305 a diversas concentraciones (que varían de 0,000488 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, las células se incubaron con anti-IgG4 humana conjugada con RPE durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado final, las células se fijaron con disolución salina de formol al 2% en BSA al 1%/PBS antes de la adquisición. Se calculó el porcentaje de unión específica utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de unión específica} = \frac{[MFI \text{ OPN305} - MFI \text{ isotipo} * 100]}{[MFI \text{ Max (OPN305)} - MFI \text{ isotipo}]}$$

Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 21A, B y C. Estos resultados demuestran que se observa una inhibición de la actividad NF- κ B de una manera dependiente de la dosis después de un tratamiento con Pam3Csk4 (figuras 21A y B). OPN-305 inhibe casi completamente la actividad NF- κ B a unas concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ (figura 21C). Se calculó el porcentaje de unión específica de OPN-305 en células THP1-CD14 utilizando la fórmula descrita anteriormente.

Se han relacionado los experimentos de unión de saturación con células THP-1, con la inhibición de la actividad biológica en la misma población de células. La inhibición completa de la señalización dependiente de TLR2 puede lograrse con menos de la unión máxima al receptor. Este es un sistema complejo y parece probable que los niveles de TLR2 sean significativamente mayores que en los compañeros heterodiméricos TLR1 y TLR6. La ocupación del receptor contempla la unión de saturación de TLR2 como un monómero o heterodímero. Parece probable que la neutralización de la cantidad suficiente de TLR2 para reducir la probabilidad de que TLR2 libre encuentre un compañero para formar un complejo de señalización funcional pueda ser una explicación para la aparente pérdida de actividad biológica a menos del 100% de ocupación de Iso receptores.

Ejemplo 10 - Determinación de si el anticuerpo OPN-305 actúa como un inhibidor competitivo o no competitivo de la señalización dependiente de TLR2Materiales y métodos

5 Se sembraron células THP1 CD14 Blue a 100.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se preincubaron brevemente con 0, 1, 10 y 100 ng/ml de OPN-305 antes de ser estimuladas con dosis variables de Pam3Csk4 durante la noche a 37 °C. Se retiraron 40 ul de sobrenadante y se inactivaron por calor a 65 °C durante 10 minutos. Se midió la actividad SEAP controlada por NF-kB incubando el medio condicionado inactivado con calor con 160 ul de reactivo Quantiblue (Invivogen) durante 90 minutos a 37 °C, seguido de una lectura a 650 nm.

10 Suponiendo que el receptor en el ensayo basado en células se comporta de modo similar a una enzima, se representó gráficamente V (actividad NF-kB) frente a S [Pam3CSK4], así como se realizaron gráficas de Lineweaver-Burk de doble recíproca (1/v frente a 1/s).

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 22, mientras que la figura 22A muestra la actividad SEAP dependiente de NF-kB frente a [Pam3CSK4], y la figura 22B muestra una gráfica de Lineweaver-Burk de 1/v frente a 1/s.

15 Estos resultados demuestran que, a medida que aumenta la concentración de ligando, se observa un desplazamiento clásico hacia la derecha de la curva de dosis-respuesta (figura 22A). El análisis de las gráficas de Lineweaver-Burk (figura 22B) sugiere un mecanismo competitivo a baja concentración de ligando, pero que la cinética cambia a medida que el ligando excede cierto umbral. El establecimiento de la naturaleza del efecto inhibitorio constituye un reto en células, puesto que la lectura de salida es la actividad biológica y esta depende no solo de la interacción TLR2/ligando, sino también del reclutamiento de TLR1 o TLR6 para generar un complejo de señalización dimerico competente. El análisis del perfil de expresión empleando bases de datos públicas sugiere que TLR2 está presente en un exceso significativo con respecto a TLR1 o TLR6, lo cual puede explicar el potencial para una respuesta bifásica como un efecto de la titulación de las moléculas compañeras.

20

Ejemplo 11 - Determinación de si la unión de OPN-305 a TLR2 altera la respuesta a otros ligandos de TLR2

25 Este experimento considera si la inhibición de TLR2 por OPN-305 afecta a la respuesta de otros TLR a sus respectivos ligandos.

Materiales y métodos

30 Se sembraron células THP1 CD14 Blue a 25.000 células por pocillo en una placa de 384 pocillos. Las células se preincubaron durante 120 minutos con 0, 1, 10 y 100 ng/ml de OPN-305 o un anticuerpo control de isotipo IgG4 humano antes de ser estimuladas con dosis variables de diferentes agonistas de ligandos del receptor de tipo Toll. Se midió directamente la actividad SEAP controlada por NF-kB en el medio condicionado después de una incubación durante la noche utilizando medio de detección HEK Blue.

Se empleó flagelina como ligando de TLR5, LPS ultrapuro como ligando de TLR4, y Pam3CSK4 y FSL-1 como ligandos de TLR2.

35 Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 23A, B y C. Las respuestas a flagelina (figura 23C) y LPS (figura 23B) no resultaron alteradas cuando se comparan con células control no expuestas a OPN-305. Tal como se espera, las respuestas de activación de TLR2 mediadas por Pam3CSK y FSL-1 fueron bloqueadas por OPN-305 (figura 23A). Las respuestas a flagelina y LPS no resultaron alteradas cuando se comparan con las células control no expuestas a OPN-305. Tal como se esperaba, las respuestas de Pam3CSK y FSL-1 fueron bloqueadas por OPN-305. Esto sugiere que OPN-305 no está provocando ningún aumento o disminución inesperados en la respuesta de TLR4 o TLR5 a los ligandos.

40

Ejemplo 12 - Uso de OPN-305 en el tratamiento de la sepsisMateriales y métodos

45 Se trataron grupos de ratones BALB/c hembra (n = 4) con el anticuerpo monoclonal OPN-305 a las dosis de 10 mg/kg, 2 mg/kg y 0,4 mg/kg, 30 minutos antes del tratamiento con 100 ug de Pam3Csk4. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal. Cuatro horas más tarde, los ratones se sacrificaron mediante anestesia letal y se extrajo la sangre. Se obtuvo el suero y se determinaron las concentraciones de citoquinas mediante ELISA. El suero se diluyó 1/10 para las ELISA de KC e IL-12p40, y 1/5 para la ELISA de IL-6.

50 Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 24A, B y C. Se demuestra que OPN305 inhibe la sepsis inducida por

Pam3Csk4. La administración de una dosis baja (0,4 mg/kg) del anti-TLR2 OPN305 puede inhibir significativamente las citoquinas inducidas por Pam3Csk4 en ratones.

5 Este experimento también se repitió con OPN-305 solo utilizando una administración i.v. (intravenosa) del anticuerpo OPN-305, seguido de una inyección i.p. (intraperitoneal) del agonista de TLR2 Pam3CSK para asegurarse de que los efectos positivos no eran consecuencia de que el anticuerpo y el agonista hayan sido administrados al mismo compartimento.

10 Los resultados de este experimento se muestran en las figura 25A y B. Los resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal OPN-305 inhibe la sepsis inducida por Pam3Csk4. Este resultado es equivalente al experimento previo, lo cual demuestra que OPN-305 administrado por vía sistémica puede inhibir la producción de citoquinas séricas en respuesta a la administración i.p. (intraperitoneal) de Pam3CSK.

Ejemplo 13 - Unión del anticuerpo monoclonal OPN-305 a TLR2 expresado sobre células de rata

Materiales y métodos

15 Se obtuvieron células NR8383 de ATCC y se cultivaron en medio FK12 según indica ATCC. Las células se bloquearon con anti-CD32 específico de rata (IgG1 de ratón) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se trataron con OPN305 (o isotipo) durante 15 minutos, se lavaron, se detectaron con anti-IgG4 humana RPE y se fijaron con disolución salina de formol al 2% antes de la adquisición. Las células NR8383 también se tiñeron con un anticuerpo anti-TLR2 de rata de conejo policlonal y se detectaron con anti-IgG de conejo Alexa-Fluor 488.

Resultados

20 Los resultados se muestran en la figura 26, que demuestra que TLR2 se expresa sobre macrófagos alveolares de rata (NR8383) y se detecta utilizando OPN305. (A) células no teñidas, (B) control positivo - el anticuerpo primario es anti-TLR2 de rata de conejo policlonal, el anticuerpo secundario es anti-conejo Alexa-Fluor 488, (C) células tratadas con IgG4 humana policlonal, el anticuerpo secundario es anti-IgG4 humana PE, (D) células teñidas con OPN305, el anticuerpo secundario es anti-IgG4 humana PE.

Ejemplo 14 - Unión del anticuerpo monoclonal OPN-305 a TLR2 expresado sobre células porcinas

Materiales y métodos

30 Se purificaron PBMC de cerdo a partir de sangre utilizando Ficoll. Las células se contaron y se colocaron 1×10^6 células por tubo. En ausencia de un reactivo de bloqueo de CD32 específico para cerdos, las células se bloquearon utilizando anti-CD32 humano en una matriz de FCS al 50%/BSA en PBS durante 10 minutos. Las células se incubaron con OPN305 (o control de isotipo) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se empleó 1H11 (anti-TLR2 de cerdo de ratón, un obsequio de Javier Domínguez) como control positivo. Después de lavar, las células se incubaron con RPE conjugado con anti-IgG4 humana durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado final, las células se fijaron, se adquirieron y se analizaron.

Resultados

35 Los resultados se muestran en la figura 27. El TLR2 se expresa en PBMC porcinas y es teñido por OPN305. Las PBMC se purificaron mediante separación utilizando Ficoll. A-C representan las PBMC del cerdo 666, y D-F del cerdo 488. A, D no está teñido; B, E está marcado con IgG4 humana policlonal control, seguido de una tinción secundaria con anti-IgG4 humana marcada con PE; C, F está marcado con OPN305, seguido por anti-IgG4 humana marcada con PE.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> OPSONA THERAPEUTICS LIMITED

5 <120> Anticuerpos humanizados contra receptores de tipo Toll 2 y sus usos

<130> P108456.WO.01/GST

10 <150> IE 2009/0514
<151> 06-07-2009

<150> US 61/270239
<151> 06-07-2009

15 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

30 <210> 2
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 488 615 T3

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

5 <210> 3
 <211> 1033
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 488 615 T3

<400> 3
gacattgtgc tcaccaatc tccagctact ttgtctctgt ctccagggga gagagccacc 60
ctctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tactatggca caagtttaat gcagtggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactcttg gtgcatccaa cgtagaatct 180
ggggtccttg acaggttcag tggcagtgga tctgggacag acttcaccct caagatcagc 240
cgggtggagg ccgaggatgt tggaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa acttccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aaacgtgagt agaatttaa ctttgcttcc 360
tcagttggat cccgcaattc taaactctga gggggtcgga tgacgtggcc attctttgcc 420
taaagcattg agtttactgc aaggtcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggtcgcga 480
agagctcaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 540
tcaaaacatc aagattttaa atacgcttct tgggtctcct gctataatta tctgggataa 600
gcatgctggt ttctgtctgt ccctaactg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 660
agggcagaac tttgttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttctcag gaactgtggc 720
tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 780
tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga 840
taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 900
cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 960
ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 1020
gggagagtgt tag 1033

5

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 4

ES 2 488 615 T3

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

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

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

- 5 <210> 5
- <211> 445
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 488 615 T3

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

ES 2 488 615 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

- <210> 6
- <211> 2163
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

ES 2 488 615 T3

<400> 6

5

caggttcagc tgggtgcagtc tggatctgag ctgaagaagc ctggggcgtc agtgaagttg

60

ES 2 488 615 T3

tcctgcaagg cttctggctt caccttcaca acctacggta taaactgggt gaggcaggcc 120
 cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatccta gagatggtag tactaacttc 180
 aatgagaatt tcaaggacag ggccacaatc actgtagaca catccgccag cacagcgtac 240
 atggaactct ccagcctgag atctgaagac actgcggtct atttctgtgc aagactgact 300
 ggtgggacat tccttgacta ttggggccag ggcaccactg tcacagtctc ctcaggtaag 360
 ctttctgggg caggccgggc ctgactttgg ctgggggcag ggagggggct aaggtgacgc 420
 aggtggcgcc agccaggtgc acacccaatg cccatgagcc cagacactgg accctgcatg 480
 gaccatcgcg gatagacaag aaccgagggg cctctgcgcc ctgggccag ctctgtccca 540
 caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcttcac caagggcca tccgtcttcc 600
 ccttggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgctgtgca 660
 aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg 720
 tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga 780
 ccgtgcctc cagcagcttg ggcacgaaga cctacacctg caatgtagat cacaagcca 840
 gcaacaccaa ggtggacaag agagttggtg agaggccagc acagggaggg aggtgtctg 900
 ctggaagcca ggctcagccc tcctgcctgg acgcaccccg gctgtgcagc cccagcccag 960
 ggcagcaagg caggcccat ctgtctctc acctggaggc ctctgaccac cccactcatg 1020
 ctcagggaga gggctctctg gatTTTTcca ccaggctccg ggcagccaca ggctggatgc 1080
 ccctaccca ggccctgcgc atacaggggc aggtgctgcg ctcagacctg ccaagagcca 1140
 tatccgggag gaccctgcc ctgacctaaag cccacccaa aggccaaact ctccactccc 1200
 tcagctcaga caccttctct cctcccagat ctgagtaact cccaatctt tctctgcaga 1260
 gtccaaatat ggtcccccac gccaccatg cccaggtaag ccaaccagc cctcgcctc 1320
 cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt agcctgcac cagggacagg cccagcccg 1380
 gtgctgacgc atccacctcc atctcttct cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag 1440
 tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctccggacc cctgaggtca 1500
 cgtgegtggg ggtggactgt agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg 1560
 atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt 1620
 accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 1680
 agtgcaaggt ctccaacaaa ggctcccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1740
 aaggtgggac ccacgggtg cgagggccac atggacagag gtcagctcgg cccaccctct 1800
 gccctgggag tgaccgctgt gccaacctct gtcctacag ggcagccccg agagccacag 1860
 gtgtacacc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1920
 ctggtcaaag gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1980
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 2040

ES 2 488 615 T3

agcaggctaa ccgtggacaa gacaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg 2100
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 2160
 tga 2163
 <210> 7
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln
 1 5 10 15
 10 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 8
Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser
 1 5
 20 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
Gln Gln Ser Arg Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5
 25 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 10
Thr Tyr Gly Ile Asn
 1 5
 35 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 11
Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15
Asp
 <210> 12
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr
 1 5
 50 <210> 13

ES 2 488 615 T3

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 13
 Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg Asn Gly
 1 5 10 15

Ile Cys Lys Gly Ser
 20

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe Thr Gln Glu Gln Gln
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 784
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15
 Met Pro His Thr Leu Trp Met Val Trp Val Leu Gly Val Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg
 20 25 30

Asn Gly Ile Cys Lys Gly Ser Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ile Pro Ser
 35 40 45

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

Thr Tyr Ile Ser Asn Ser Asp Leu Gln Arg Cys Val Asn Leu Gln Ala
 65 70 75 80

ES 2 488 615 T3

Leu Val Leu Thr Ser Asn Gly Ile Asn Thr Ile Glu Glu Asp Ser Phe
 85 90 95
 Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Tyr Leu
 100 105 110
 Ser Asn Leu Ser Ser Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ser Ser Leu Thr Phe
 115 120 125
 Leu Asn Leu Leu Gly Asn Pro Tyr Lys Thr Leu Gly Glu Thr Ser Leu
 130 135 140
 Phe Ser His Leu Thr Lys Leu Gln Ile Leu Arg Val Gly Asn Met Asp
 145 150 155 160
 Thr Phe Thr Lys Ile Gln Arg Lys Asp Phe Ala Gly Leu Thr Phe Leu
 165 170 175
 Glu Glu Leu Glu Ile Asp Ala Ser Asp Leu Gln Ser Tyr Glu Pro Lys
 180 185 190
 Ser Leu Lys Ser Ile Gln Asn Val Ser His Leu Ile Leu His Met Lys
 195 200 205
 Gln His Ile Leu Leu Leu Glu Ile Phe Val Asp Val Thr Ser Ser Val
 210 215 220
 Glu Cys Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asp Leu Asp Thr Phe His Phe Ser
 225 230 235 240
 Glu Leu Ser Thr Gly Glu Thr Asn Ser Leu Ile Lys Lys Phe Thr Phe
 245 250 255
 Arg Asn Val Lys Ile Thr Asp Glu Ser Leu Phe Gln Val Met Lys Leu
 260 265 270
 Leu Asn Gln Ile Ser Gly Leu Leu Glu Leu Glu Phe Asp Asp Cys Thr
 275 280 285
 Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile
 290 295 300
 Asp Pro Gly Lys Val Glu Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro
 305 310 315 320
 Arg Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Glu
 325 330 335

ES 2 488 615 T3

Arg Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro
 340 345 350

Cys Leu Leu Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
 355 360 365

Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp
 370 375 380

Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala
 385 390 395 400

Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
 405 410 415

Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys
 420 425 430

Gln Trp Pro Glu Lys Met Lys Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Arg Ile
 435 440 445

His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val
 450 455 460

Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys
 465 470 475 480

Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser
 485 490 495

Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr
 500 505 510

Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu
 515 520 525

Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe
 530 535 540

Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Asp Trp Pro Ala
 545 550 555 560

Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln
 565 570 575

Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser
 580 585 590

Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu

ES 2 488 615 T3

	595		600		605														
Cys	His	Arg	Phe	His	Gly	Leu	Trp	Tyr	Met	Lys	Met	Met	Trp	Ala	Trp				
	610					615					620								
Leu	Gln	Ala	Lys	Arg	Lys	Pro	Arg	Lys	Ala	Pro	Ser	Arg	Asn	Ile	Cys				
625					630					635					640				
Tyr	Asp	Ala	Phe	Val	Ser	Tyr	Ser	Glu	Arg	Asp	Ala	Tyr	Trp	Val	Glu				
				645					650					655					
Asn	Leu	Met	Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Asn	Pro	Pro	Phe	Lys	Leu				
			660					665					670						
Cys	Leu	His	Lys	Arg	Asp	Phe	Ile	Pro	Gly	Lys	Trp	Ile	Ile	Asp	Asn				
		675					680					685							
Ile	Ile	Asp	Ser	Ile	Glu	Lys	Ser	His	Lys	Thr	Val	Phe	Val	Leu	Ser				
	690					695					700								
Glu	Asn	Phe	Val	Lys	Ser	Glu	Trp	Cys	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Phe	Ser				
705					710					715					720				
His	Phe	Arg	Leu	Phe	Glu	Glu	Asn	Asn	Asp	Ala	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu				
				725					730					735					
Leu	Glu	Pro	Ile	Glu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Gln	Arg	Phe	Cys	Lys	Leu				
			740					745					750						
Arg	Lys	Ile	Met	Asn	Thr	Lys	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Pro	Met	Asp	Glu				
		755					760					765							
Ala	Gln	Arg	Glu	Gly	Phe	Trp	Val	Asn	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Ser				
	770					775					780								

<210> 16
 <211> 784
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 16

5

ES 2 488 615 T3

Met Leu Arg Ala Leu Trp Leu Phe Trp Ile Leu Val Ala Ile Thr Val
1 5 10 15

Leu Phe Ser Lys Arg Cys Ser Ala Gln Glu Ser Leu Ser Cys Asp Ala
20 25 30

Ser Gly Val Cys Asp Gly Arg Ser Arg Ser Phe Thr Ser Ile Pro Ser
35 40 45

ES 2 488 615 T3

Gly Leu Thr Ala Ala Met Lys Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asn Lys Ile
50 55 60

Thr Tyr Ile Gly His Gly Asp Leu Arg Ala Cys Ala Asn Leu Gln Val
65 70 75 80

Leu Met Leu Lys Ser Ser Arg Ile Asn Thr Ile Glu Gly Asp Ala Phe
85 90 95

Tyr Ser Leu Gly Ser Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Asp Asn His Leu
100 105 110

Ser Ser Leu Ser Ser Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ser Ser Leu Lys Tyr
115 120 125

Leu Asn Leu Met Gly Asn Pro Tyr Gln Thr Leu Gly Val Thr Ser Leu
130 135 140

Phe Pro Asn Leu Thr Asn Leu Gln Thr Leu Arg Ile Gly Asn Val Glu
145 150 155 160

Thr Phe Ser Glu Ile Arg Arg Ile Asp Phe Ala Gly Leu Thr Ser Leu
165 170 175

Asn Glu Leu Glu Ile Lys Ala Leu Ser Leu Arg Asn Tyr Gln Ser Gln
180 185 190

Ser Leu Lys Ser Ile Arg Asp Ile His His Leu Thr Leu His Leu Ser
195 200 205

Glu Ser Ala Phe Leu Leu Glu Ile Phe Ala Asp Ile Leu Ser Ser Val
210 215 220

Arg Tyr Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asn Leu Ala Arg Phe Gln Phe Ser
225 230 235 240

Pro Leu Pro Val Asp Glu Val Ser Ser Pro Met Lys Lys Leu Ala Phe
245 250 255

Arg Gly Ser Val Leu Thr Asp Glu Ser Phe Asn Glu Leu Leu Lys Leu
260 265 270

Leu Arg Tyr Ile Leu Glu Leu Ser Glu Val Glu Phe Asp Asp Cys Thr
275 280 285

Leu Asn Gly Leu Gly Asp Phe Asn Pro Ser Glu Ser Asp Val Val Ser
290 295 300

Glu Leu Gly Lys Val Glu Thr Val Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro
 305 310 315 320
 Gln Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Val Tyr Ser Leu Leu Glu
 325 330 335
 Lys Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro
 340 345 350
 Cys Ser Phe Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Phe Leu Asp Leu Ser
 355 360 365
 Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Lys Gly
 370 375 380
 Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Val Leu Ser Gln Asn His Leu Arg
 385 390 395 400
 Ser Met Gln Lys Thr Gly Glu Ile Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
 405 410 415
 Ser Leu Asp Ile Ser Arg Asn Thr Phe His Pro Met Pro Asp Ser Cys
 420 425 430
 Gln Trp Pro Glu Lys Met Arg Phe Leu Asn Leu Ser Ser Thr Gly Ile
 435 440 445
 Arg Val Val Lys Thr Cys Ile Pro Gln Thr Leu Glu Val Leu Asp Val
 450 455 460
 Ser Asn Asn Asn Leu Asp Ser Phe Ser Leu Phe Leu Pro Arg Leu Gln
 465 470 475 480
 Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Lys Thr Leu Pro Asp Ala Ser
 485 490 495
 Leu Phe Pro Val Leu Leu Val Met Lys Ile Arg Glu Asn Ala Val Ser
 500 505 510
 Thr Phe Ser Lys Asp Gln Leu Gly Ser Phe Pro Lys Leu Glu Thr Leu
 515 520 525
 Glu Ala Gly Asp Asn His Phe Val Cys Ser Cys Glu Leu Leu Ser Phe
 530 535 540
 Thr Met Glu Thr Pro Ala Leu Ala Gln Ile Leu Val Asp Trp Pro Asp
 545 550 555 560
 Ser Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Pro Arg Leu His Gly His Arg Leu Gln

ES 2 488 615 T3

				565						570										575
Asp	Ala	Arg	Pro	Ser	Val	Leu	Glu	Cys	His	Gln	Ala	Ala	Leu	Val	Ser					
			580					585					590							
Gly	Val	Cys	Cys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Leu					
		595					600					605								
Cys	His	His	Phe	His	Gly	Leu	Trp	Tyr	Leu	Arg	Met	Met	Trp	Ala	Trp					
	610					615					620									
Leu	Gln	Ala	Lys	Arg	Lys	Pro	Lys	Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Asp	Val	Cys					
625					630					635					640					
Tyr	Asp	Ala	Phe	Val	Ser	Tyr	Ser	Glu	Gln	Asp	Ser	His	Trp	Val	Glu					
				645					650					655						
Asn	Leu	Met	Val	Gln	Gln	Leu	Glu	Asn	Ser	Asp	Pro	Pro	Phe	Lys	Leu					
			660					665					670							
Cys	Leu	His	Lys	Arg	Asp	Phe	Val	Pro	Gly	Lys	Trp	Ile	Ile	Asp	Asn					
		675					680					685								
Ile	Ile	Asp	Ser	Ile	Glu	Lys	Ser	His	Lys	Thr	Val	Phe	Val	Leu	Ser					
	690					695					700									
Glu	Asn	Phe	Val	Arg	Ser	Glu	Trp	Cys	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp	Phe	Ser					
705					710					715					720					
His	Phe	Arg	Leu	Phe	Asp	Glu	Asn	Asn	Asp	Ala	Ala	Ile	Leu	Val	Leu					
				725					730					735						
Leu	Glu	Pro	Ile	Glu	Arg	Lys	Ala	Ile	Pro	Gln	Arg	Phe	Cys	Lys	Leu					
			740					745					750							
Arg	Lys	Ile	Met	Asn	Thr	Lys	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Pro	Leu	Asp	Glu					
		755					760					765								
Gly	Gln	Gln	Glu	Val	Phe	Trp	Val	Asn	Leu	Arg	Thr	Ala	Ile	Lys	Ser					
	770					775					780									

5 <210> 17
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (333)

ES 2 488 615 T3

<400> 17
gac att gtg ctc acc caa tct cca gct act ttg tct ctg tct cca ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag aga gcc acc ctc tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gaa tac tat 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

ggc aca agt tta atg cag tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa ctc ctc atc ttt ggt gca tcc aac gta gaa tct ggg gtc cct gac 192
Lys Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg acā gac ttc acc ctc aag atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

cgg gtg gag gcc gag gat gtt gga atg tat ttc tgt cag caa agt agg 288
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

aaa ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag gtg gaa atc aaa 333
Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

5 <210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 18

ES 2 488 615 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 354
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(354)

<400> 19

ES 2 488 615 T3

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga tct gag ctg aag aag cct ggg gcg 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc ttc acc ttc aca acc tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

ggt ata aac tgg gtg agg cag gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
 Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tgg att tat cct aga gat ggt agt act aac ttc aat gag aat ttc 192
 Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

aag gac agg gcc aca atc act gta gac aca tcc gcc agc aca gcg tac 240
 Lys Asp Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctc tcc agc ctg aga tct gaa gac act gcg gtc tat ttc tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gca aga ctg act ggt ggg aca ttc ctt gac tat tgg ggc cag ggc acc 336
 Ala Arg Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

act gtc aca gtc tcc tca 354
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

5

10

ES 2 488 615 T3

Lys Asp Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 21
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Val
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Val Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr

ES 2 488 615 T3

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

<210> 23
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 23

5

ES 2 488 615 T3

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

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

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ala Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 24
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 24

5

ES 2 488 615 T3

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

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

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Asn Phe Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Gly Thr Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo neutralizante, o una de sus porciones de unión al antígeno, que comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:1, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:1, y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:4, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, en el que el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une específicamente al dominio extracelular del receptor de tipo Toll 2 y antagoniza la función del receptor de tipo Toll 2, en el que dicho antagonismo es mediado independientemente de la unión del anticuerpo, o de una de sus porciones de unión al antígeno, a CD32.
- 10 2.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera se une a un dominio constante kappa.
- 3.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 según la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio variable de la cadena pesada se une a un dominio constante derivado de un anticuerpo de la subclase de la inmunoglobulina G, isotipo 4.
- 15 4.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 según la reivindicación 3, en el que el resto aminoácido 241 de una región de bisagra de la cadena pesada está sustituido de un resto serina a un resto prolina.
- 5.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 20 6.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.
- 7.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 o la porción de unión al antígeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humanizado.
- 8.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 o la porción de unión al antígeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo aislado.
- 25 9.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 o la porción de unión al antígeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o la porción de unión al antígeno se une al receptor de tipo Toll 2 humano con una K_D de 3×10^{-8} M o menor.
- 30 10.- El anticuerpo neutralizante del receptor de tipo Toll 2 o la porción de unión al antígeno según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, y el dominio variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.
- 11.- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 12.- Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11.
- 13.- Una célula hospedante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.
- 35 14.- Un método para preparar el anticuerpo del receptor de tipo Toll 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de expresar el anticuerpo en la célula hospedante de la reivindicación 13, y aislar el anticuerpo de la célula hospedante.
- 40 15.- Un anticuerpo, o una de sus porciones de unión al antígeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno inflamatorio, respiratorio o autoinmunitario que está mediado por la activación del receptor de tipo Toll 2, en el que la enfermedad o el trastorno inflamatorio, respiratorio o autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, respuesta alérgica, psoriasis, dermatitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión, isquemia-reperfusión que se origina de un trasplante de órganos, enfermedad ocular, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, inflamación renal y diabetes.
- 45 16.- Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo, o una de sus porciones de unión al antígeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQ
QKPGQPPKLLIFGASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
AEDVGMVFCQSRKLPWTFGGGTKVEIK

Figura 1A - SEQ ID NO:1


```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GACATTGCTCAACCCAAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCAGSGGAGAGACCCCACTTCTCTGAGAGACCCCAAGTGAAGTGTGATTAATGGA
D I V L T T Q S P A T T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V E Y Y G
10
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
CAAGTTAATGCAGTGTACCAAGAAACCAAGACAGCACCCTCACTCTCATCTTTGGTGCATCCCAAGTAGAATCTGGGTCCCTGACAGGTTCA
T S L M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I F G A S N V E S G V P D R F S
30 40 50 60
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAACCTCAAGATCAGCCGGTGGAGGCCGAGATGTTGGAAATGTAATTTCTGTCAGCAAGTAGAAACTTCCGTGG
G S Q S G T D F T L K I S R V E A E D V G M Y F C Q Q S R K L P W
70 80 90
310 320 330
ACGTTGGGTGAGGCAACCAAGGTGGAATCAAA
T P G G G T K V E I K
100 106 a

```

Figura 1B

QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWVRQAP
GQGLEWIGWYPRDGSTNFNENFKDRATITVDTSASTAYMEL
SSLRSEDTAVYFCARLTGGTFLDYWGQGTTTVSS

Figura 2A – SEQ ID NO:4

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CAGTTTCACTGGTGGCAAGTCTGATCTGAGCTGAGAGAGCCCTGGGCGGTCACTGAGTGTGTCCTGCAAGGCTTCTGCTTCACTTCAQAACCTTAAGTGA
Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K L S C K A S G F T F T Y G
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAACTGGGTGAGGCAAGGCCCTGGACAAGGACTTGGAGTGGATTTGGATTTTATCCTTAGAGATGCTAGTACTTACTTCAATGAGAAATTTCAAGGACAG
I N W V R Q A P G Q G L E W I G W I Y P R D G S T N F N E N F K D R
40
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACATCACTGTAGACATCCGCCAGACAGCCGTACATGGAACTCTCCAGCCCTGAGATCTGAGAGACACTCCGCTTATTTCTGTGGAGACTGACT
A T I T V D T S A S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y F C A R L T
70
310     320     330     340
GGTGGACATTCCTTGACTATTTGGGGCCAGGGCAACCACTGTCAACAGTCTTCCCTCA
G G T F L D Y W G Q G T T V T V S S
100 a
110

```

Figura 2B

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQ
QKPGQPPKLLIFGASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
AEDVGMVFCQQSRKLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

Figura 3 – SEQ ID NO:2

GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCAG
GGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGAATA
CTATGGCACAAGTTTAATGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAG
CCACCCAAACTCCTCATCTTTGGTGCATCCAACGTAGAATCTGGGG
TCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCT
CAAGATCAGCCGGGTGGAGGCCGAGGATGTTGGAATGTATTTCTGT
CAGCAAAGTAGGAAACTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGG
TGGAAATCAAACGTGAGTAGAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGG
ATCCCGCAATTCTAAACTCTGAGGGGGTTCGGATGACGTGGCCATTC
TTTGCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAA
AGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAAC
TTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAACATCAA
GATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGAT
AAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCC
GCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATC
CTGTTTGCTTCTTTCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Figura 4 – SEQ ID NO:3

QVQLVQSGSELKKPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRD
GSTNFNENFKDRATITVDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARLTGGTFLDYWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLGK

Figura 5 – SEQ ID NO:5

CAGGTT CAGCTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCGT CAGTGAAGTTG
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTTACCTTCAACAACCTACGGTATAAACTGGGTGAGGCAGGCC
 CCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAACTTC
 AATGAGAATTTCAAGGACAGGGCCACAATCACTGTAGACACATCCGCCAGCACAGCGTAC
 ATGGAACTCTCCAGCCTGAGATCTGAAGACACTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGACTGACT
 GGTGGGACATTCTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTGT CACAGTCTCCTCAGGTAAG
 CTTTCTGGGGCAGGCCGGGCTGACTTTGGCTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGACGC
 AGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCATGAGCCAGACACTGGACCCTGCATG
 GACCATCGCGGATAGACAAGAACCAGGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCA
 CACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTG CAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCC
 CCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
 AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGC
 TGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
 CCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCTAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG
 CTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAG
 GGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCCTCACCTGGAGGCTCTGACCACCCACTCATG
 CTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGC
 CCTACCCAGGCCCTGCGCATA CAGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCA
 TATCCGGGAGGACCCTGCCCCGACCTAAGCCACCCCAAAGGCCAAACTCTGCACTCCC
 TCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGA
 GTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTC
 CAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGG
 GTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAG
 TCTTCTGTTCACCCCAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
 CGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC AACTGGTACGTGG
 ATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
 AAGCTGGGACCCACGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCTCT
 GCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGAOCAA GAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACA ACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGAGGGCTCCTTCTTCTCTAC
 AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCGGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
 TGA

Figura 6 – SEQ ID NO:6

1 mphtlwmvww lqviislske essnqaslsc drngickgss gslnsipsgl teavksldls
 61 nnrityisns dlqrcvnlqa lvltsngint ieedsfsslq slehldlsyn ylsnlssswf
 121 kplssltfln llgnpyktlg etslfshtk lqilrvgnmd tftkiqrkdf agltfleele
 181 idasdlqsy pkslksiqnv shliihmkqh illeifvdv tssveclelr dtdldtfhfs
 241 elstgetnsl ikkftfrnvk itdeslfqvm kllnqisgll elefddctln gvgnfrasn
 301 drvidpgkve titirrlhip rfylyfdlst lysltervkr itvenskvfl vpcllsqhlk
 361 sleylisen lmveeylkns acedawpslq tliirqnhla slektgetll tknltnidi
 421 sknsfhsmpc tcqwpekmky lnlstrihs vtgcipktle ildvsnnln lfslnlpqk
 481 elyisrnklm tlpdasllpm llvlkisrna ittfskeqld sfhtlktlea gggnficsce
 541 flsftgeqqa lakvlidwpa nylcdspshv rgqqvqdvrl svsechrtal vsgmccalfl
 601 lilltgvich rfhglwymkm mwawlqakrk prkapsrnic ydafvsyser daywvenlmv
 661 qelenfnppf klclhkrdfi pgkwiidnii dsiekshktv fvlsenfvks ewckyeldfs
 721 hfrlfeennd aailillepi ekkaipqrfc klrkimntkt ylewpmdeaq regfwvnra
 781 aiks

Figura 7 - Secuencia de aminoácidos del TLR2 humano

1 mlralwlfwi lvaitvlfsk rcsaqeslsc dasgvcdgrs rsftsipsgl taamksldls
 61 fnkityighg dlracanlqv lmlkssrint iegdafyslg slehldlsdn hlsslssswf
 121 gplsslkyln lmgnpqytlg vtslfpnltn lqtlrignve tfseirridf agltsinele
 181 ikalslrnyq sqslksirdi hhlthlhes afllleifadi lssvrylelr dtnlarfqfs
 241 plpvdevssp mkklafrgsv ltdesfnell kllryilels evefddctln glgdfnpses
 301 dvvselgkve tvtirrlhip qfylfydlst vysllekvkr itvenskvfl vpcsfsqlk
 361 slefldsen lmveeylkns ackgawpslq tlvlsqnhlr smqktgeill tknltsldi
 421 srntfhpmpd scqwpekmrf lnlsstgirv vktcipqtle vldvsnnnld sfsflprlq
 481 elyisrnklk tlpdaslfpv llvmkirena vstfksdqlg sfpkletlea gdnhfvcsc
 541 llsftmetpa laqilvdwpd sylcdsprrl hghrlqdarv svlechqaal vsgvccalll
 601 lillvgaich hfhglwylrm mwawlqakrk pkkapcrdvc ydafvsyseq dshwvenlmv
 661 qqlensdppf klclhkrdfv pgkwiidnii dsiekshktv fvlsenfvrs ewckyeldfs
 721 hfrlfdennnd aailvlepi erkaipqrfc klrkimntkt ylewpldegq qevfwvnlrt
 781 aiks

Figura 8 - Secuencia de aminoácidos del TLR2 murino

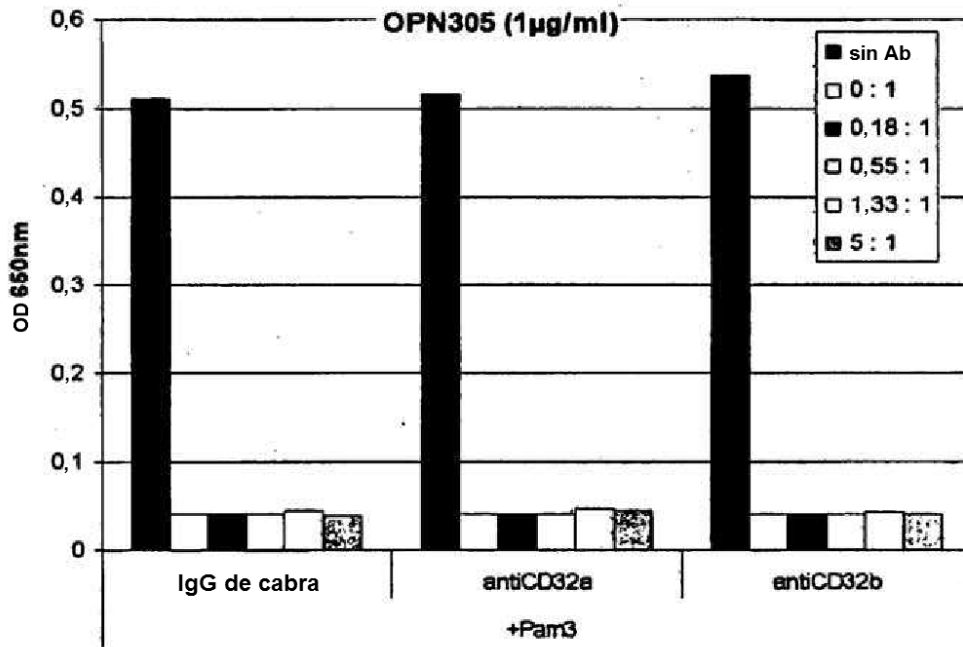


Figura 9

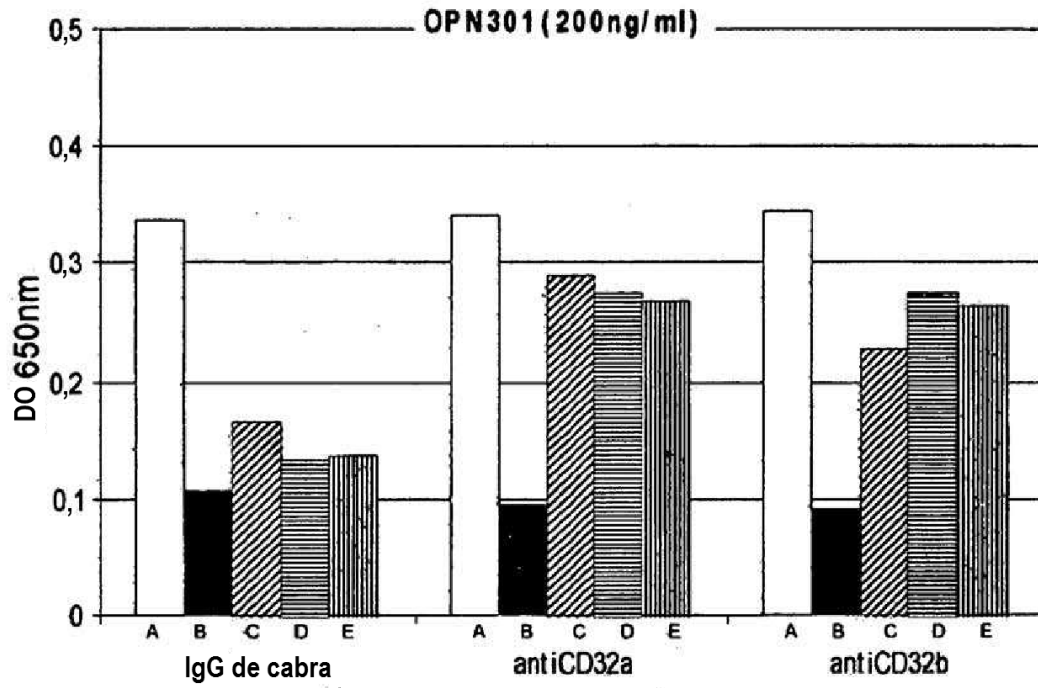


Figura 10A

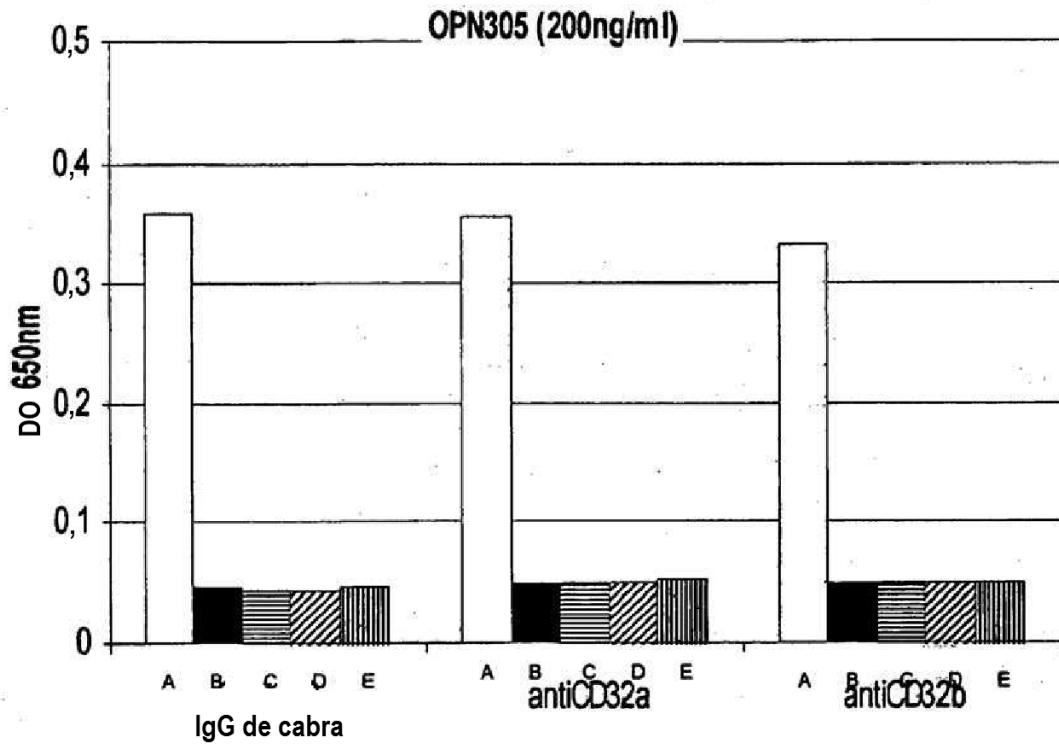


Figura 10B

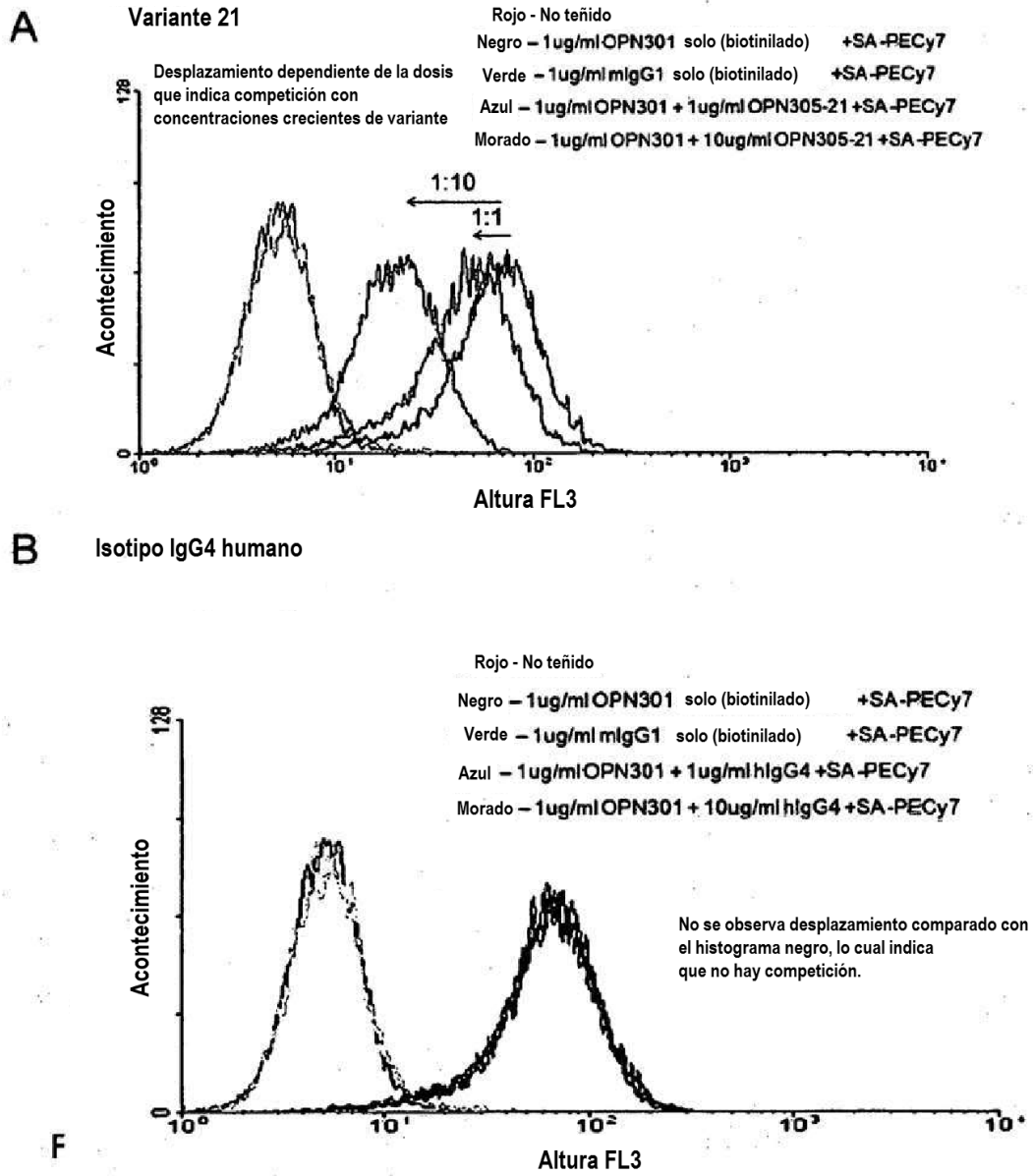


Figura 11

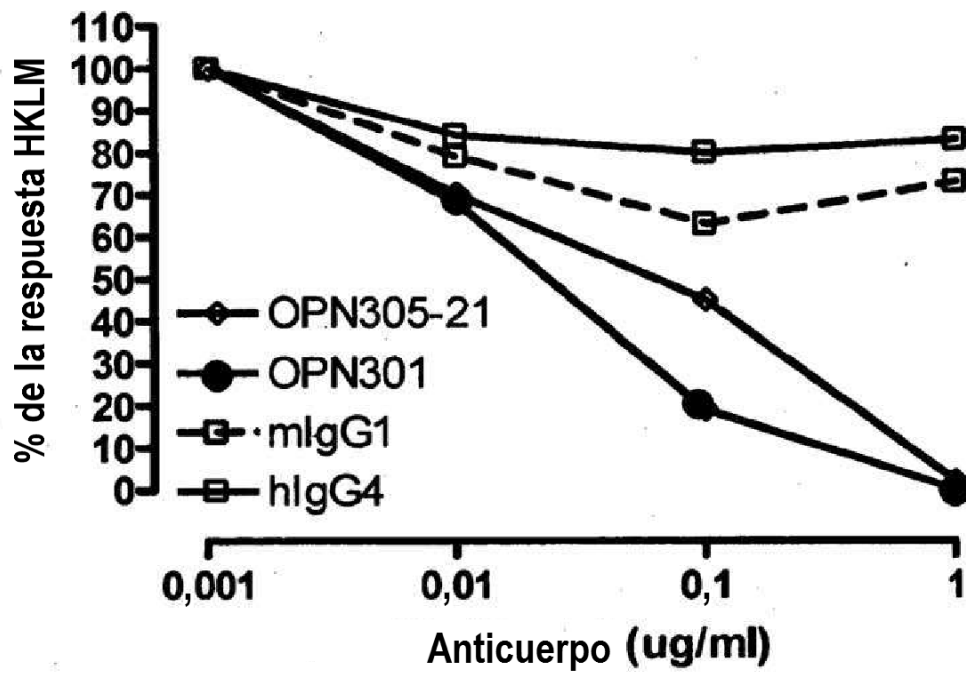


Figura 12

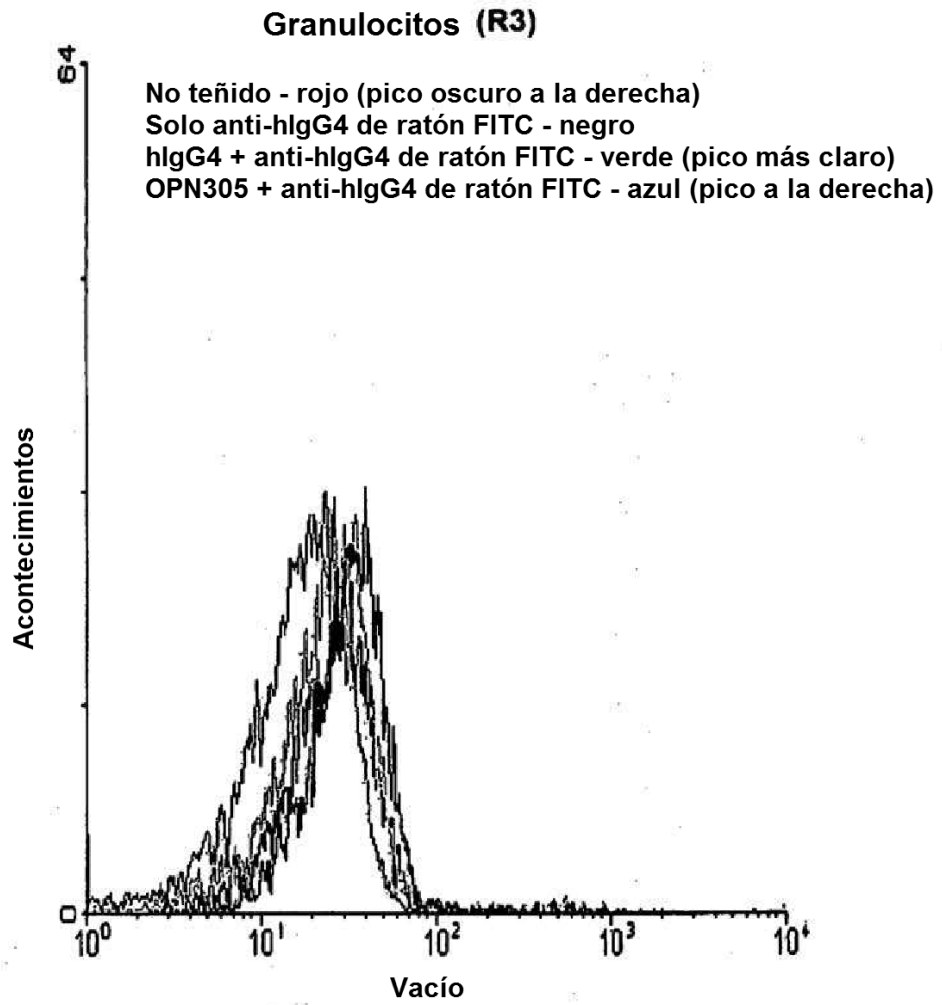


Figura 13(A)

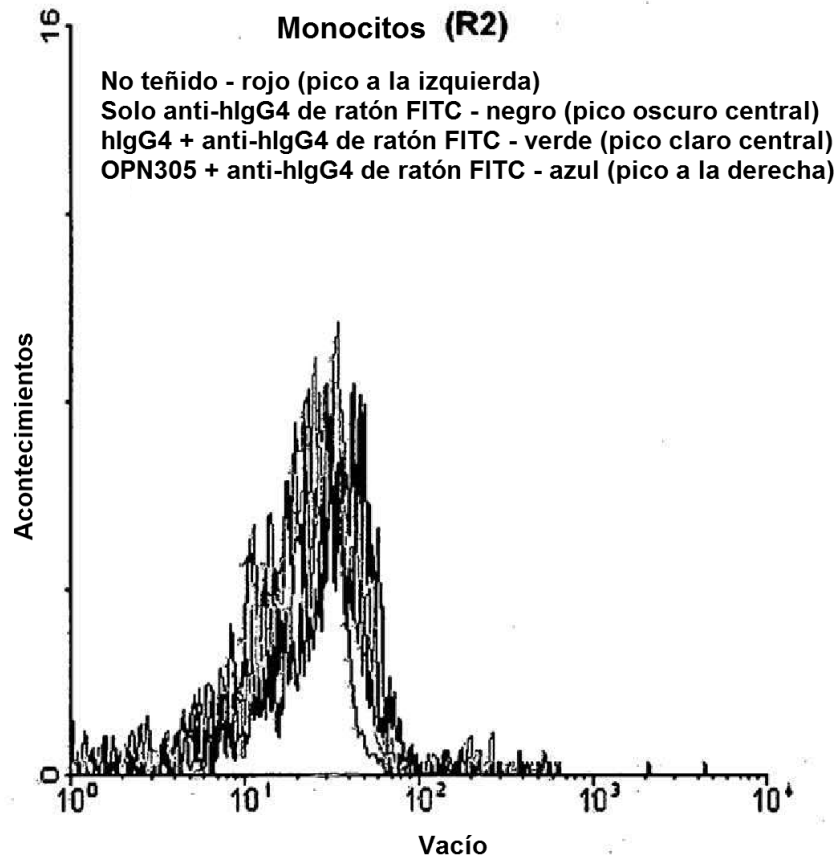


Figura 13(B)

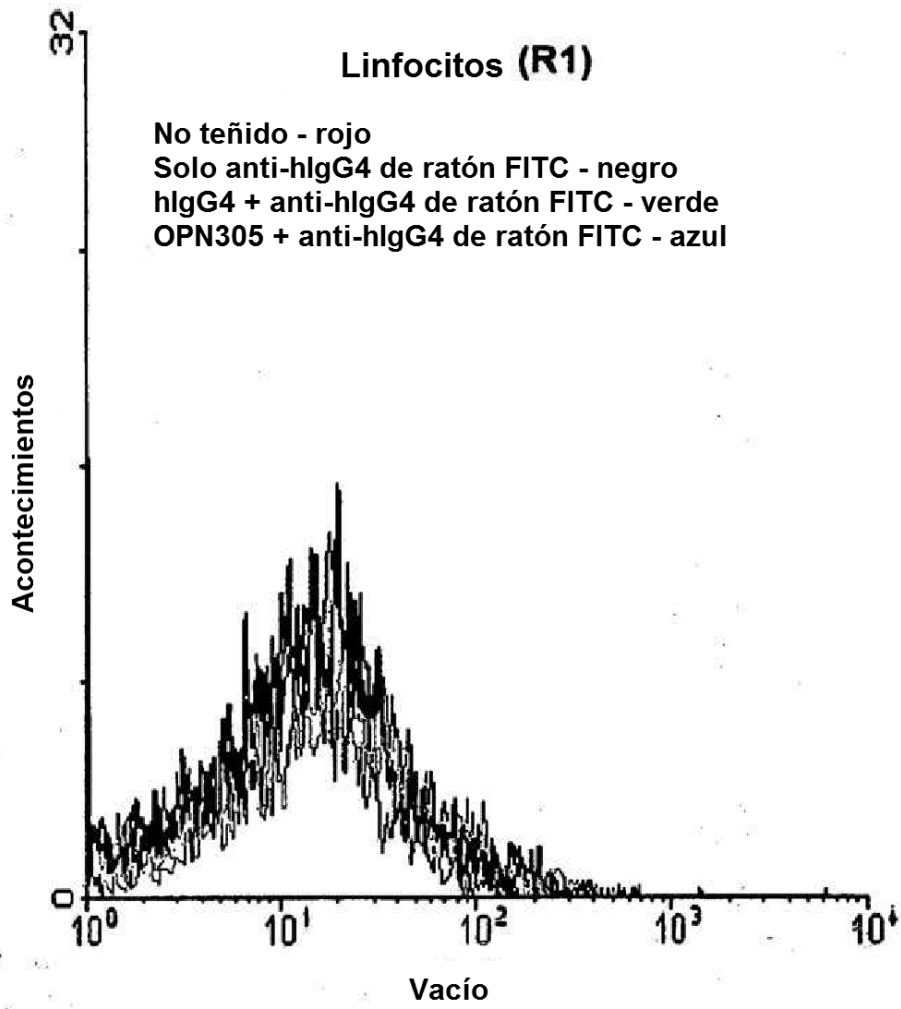
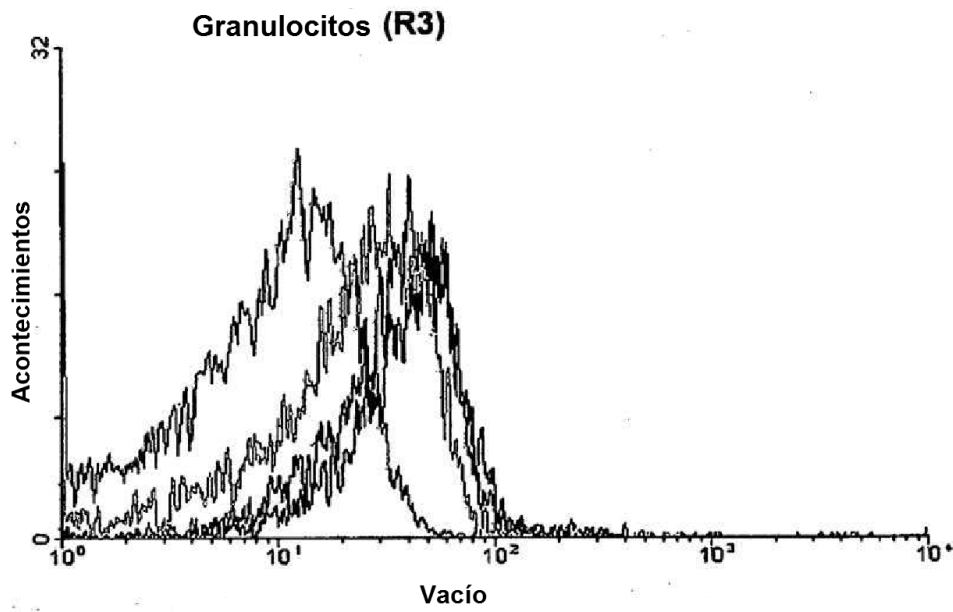
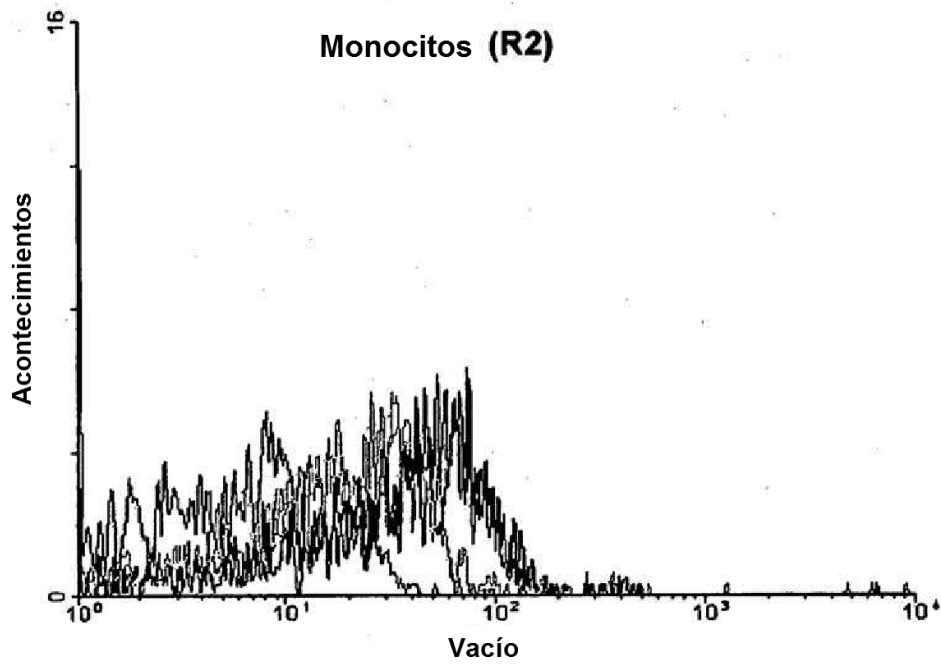


Figura 13(C)



No teñido - rojo (primer pico)
Biotina OPN301 + SAPECy7 - negro (cuarto pico)
Biotina 301 + 10x OPN305-20 - verde (segundo pico)
Biotina OPN301 + 10x hlgG4 - azul (tercer pico de I a D)

Figura 14(A)



No teñido - rojo (primer pico (de izquierda a derecha))
Biotina OPN301 + SAPECy7 - negro (cuarto pico)
Biotina 301 + 10x OPN305-20 - verde (segundo pico)
Biotina OPN301 + 10x hlgG4 - azul (tercer pico)

Figura 14(B)

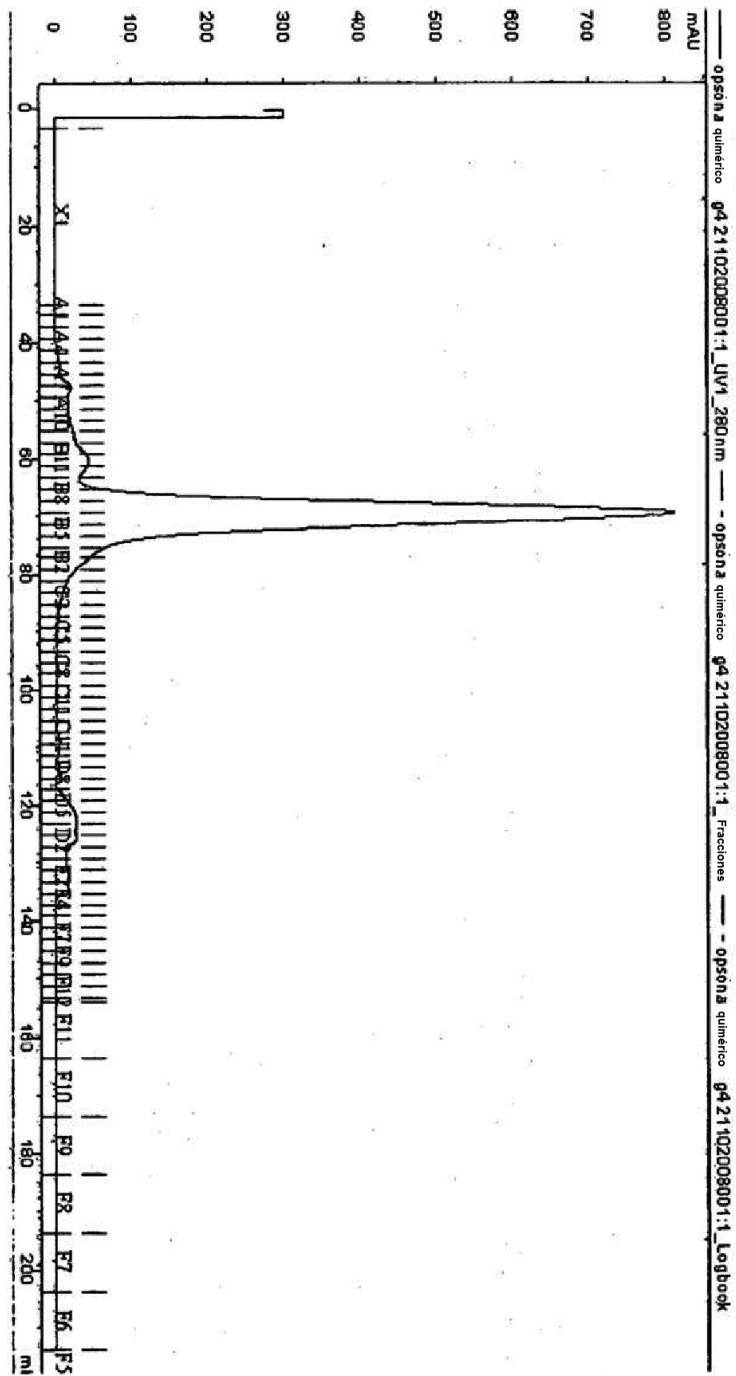


Figura 15 (A)

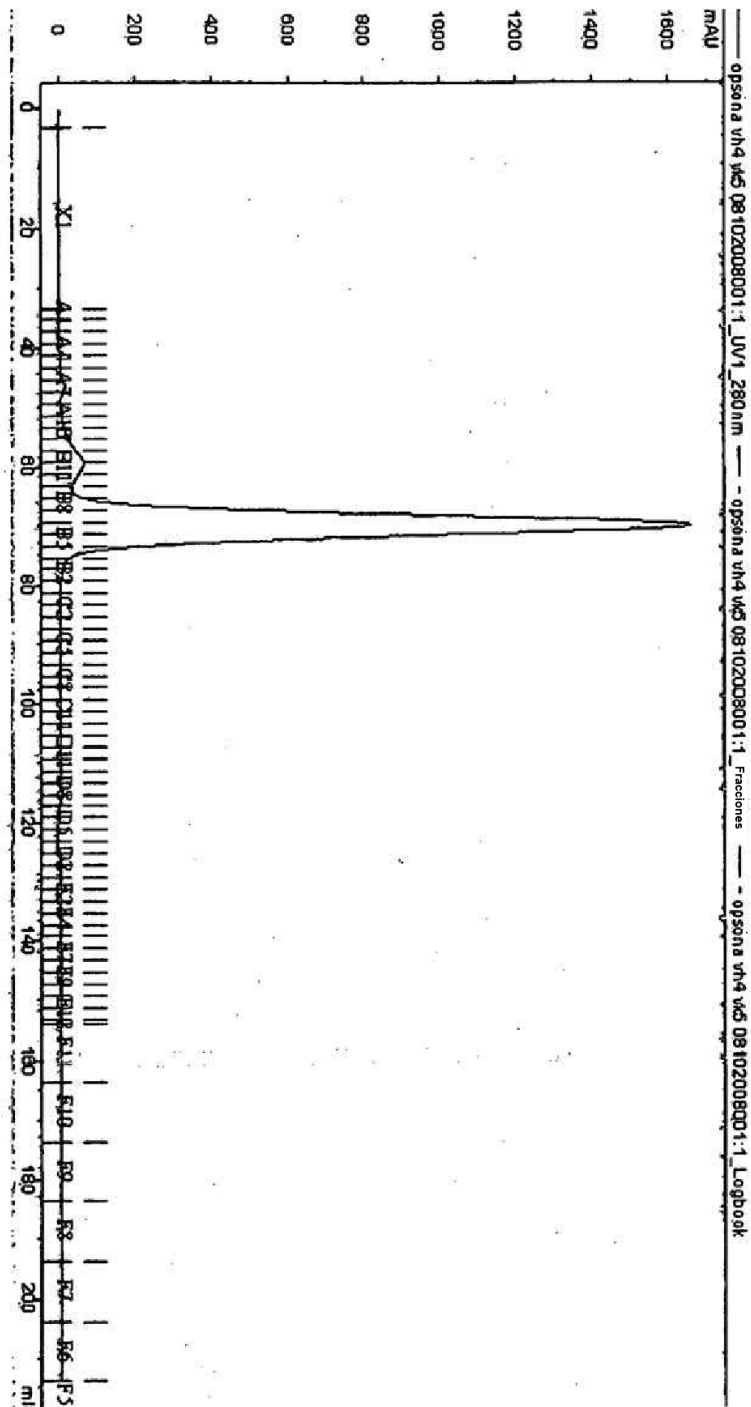


Figura 15 (B)

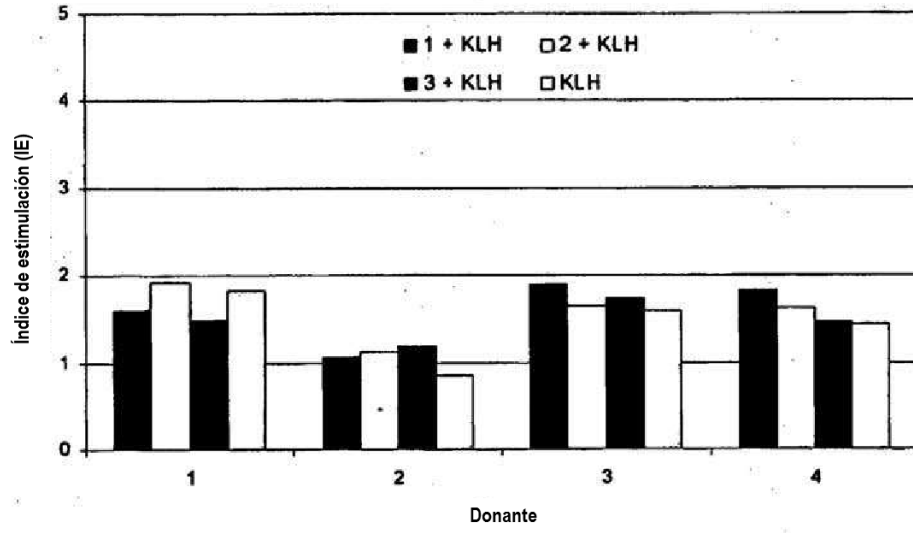


Figura 16

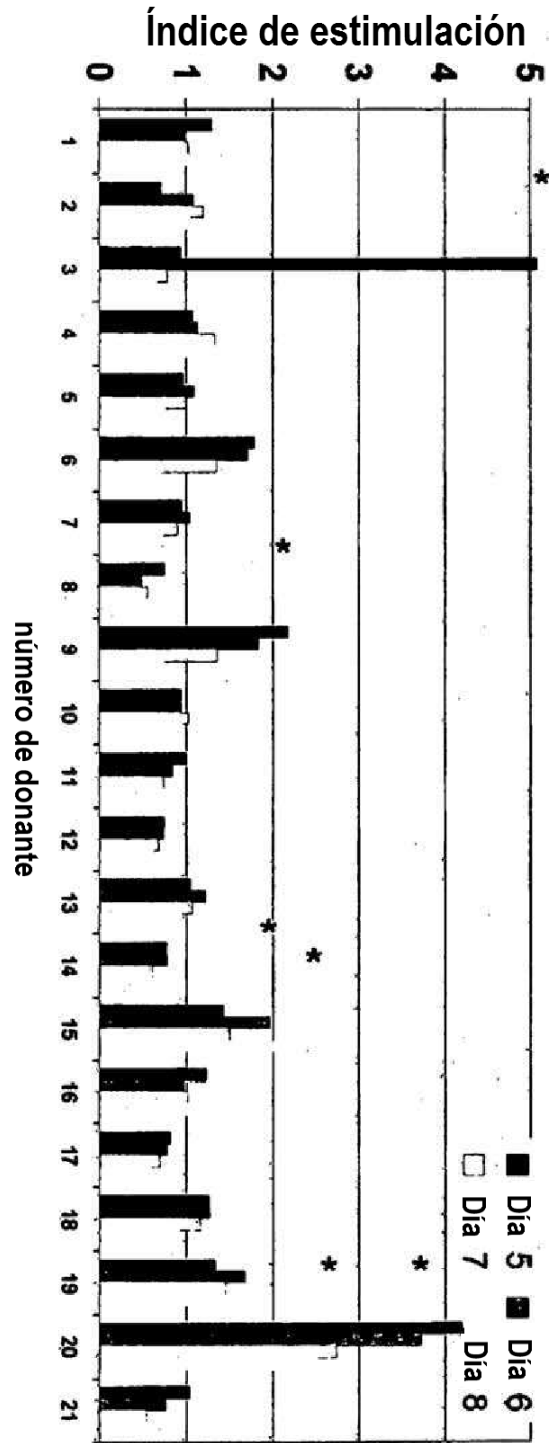


Figura 17(A)

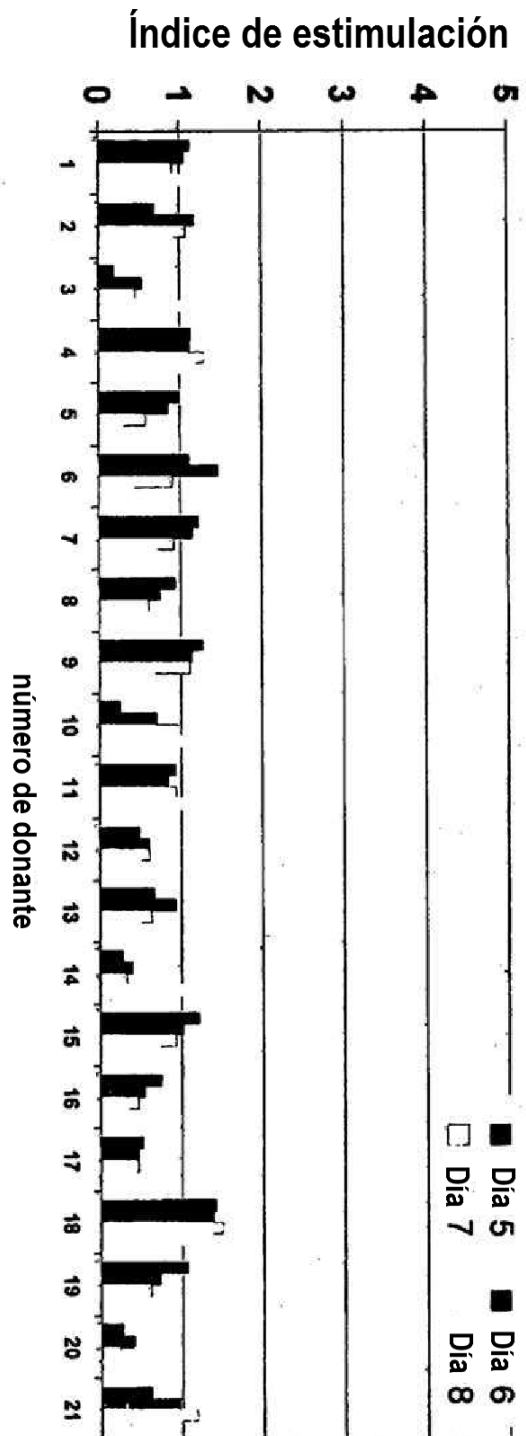


Figura 17(B)

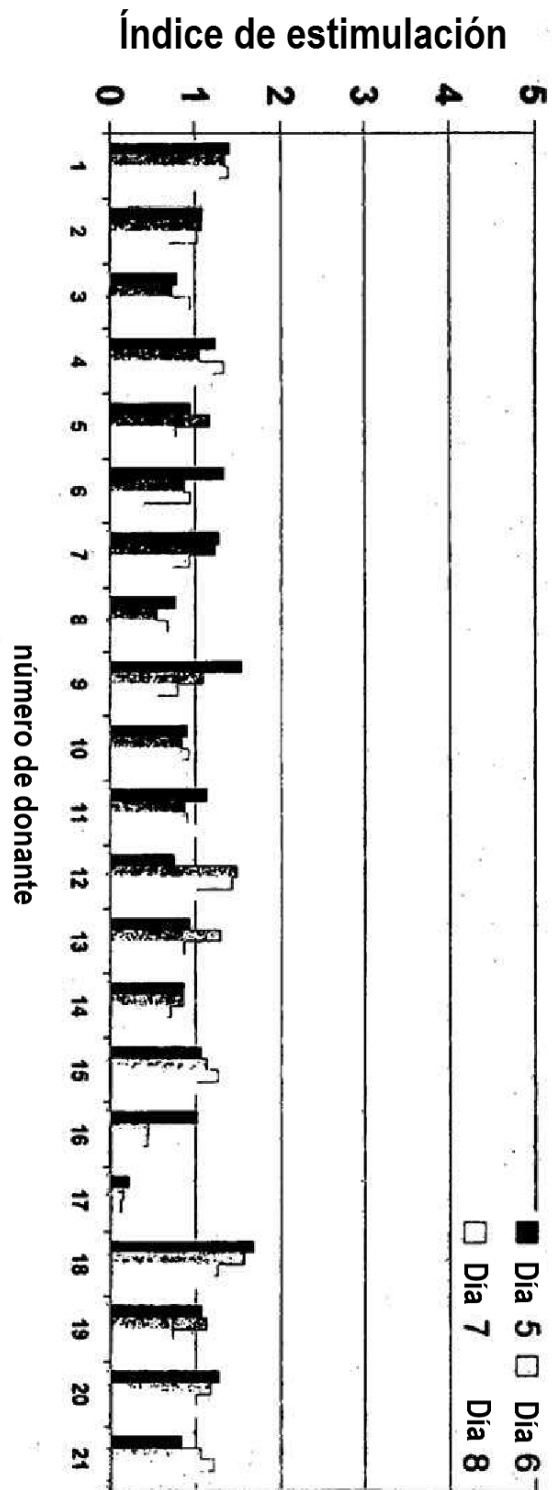


Figura 17(C)

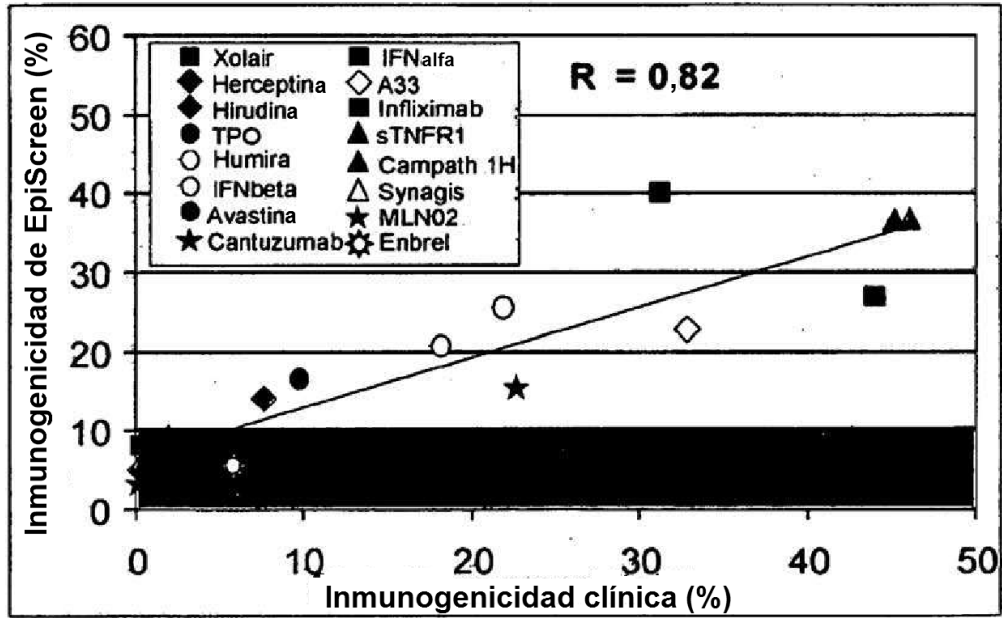


Figura 18

```
T2.5      1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFGASNVES
OPN-305   1 DIVLTQSPASLALSLGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFGASNVES
          ***** ** * *****

T2.5      61 GVPVRFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIVMYFCQQRKLPWTFGGGKLEIK
OPN-305   61 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEEDVGMVFCQQRKLPWTFGGGKVEIK
          *** ***** * * *** * ***** **
```

89,2% de identidad en solapamiento de 111 restos; puntuación: 523,0; frecuencia de hueco: 0,0%

Figura 19

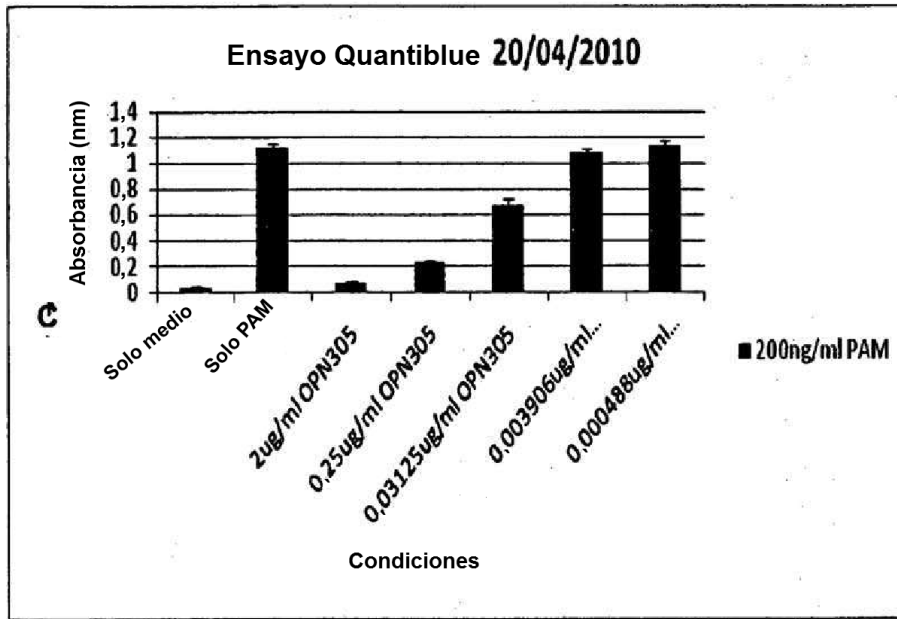
```
T2.5      1 QVQLQQSGPELVNPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWVKQPGQGLEWIGWIYPRDGSTNF
OPN-305   1 QVQLVQSGSELKPGASVKLSCKASGFTFTTYGINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRDGSTNF
          ****  ***  *  ***** * *****

T2.5      61 NENFKDKAALTVDTSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCARLTGGTFLDYWGQGTTLTVSS
OPN-305   61 NENFKDRATITVDTASAYMELSLRSEDVAVYFCARLTGGTFLDYWGQGTITVTVSS
          ***** *  ***** ***** *  *  ***** *****
```

88,1% de identidad en solapamiento de 118 restos; puntuación: 563,0; frecuencia de hueco: 0,0%

Figura 20

A



B

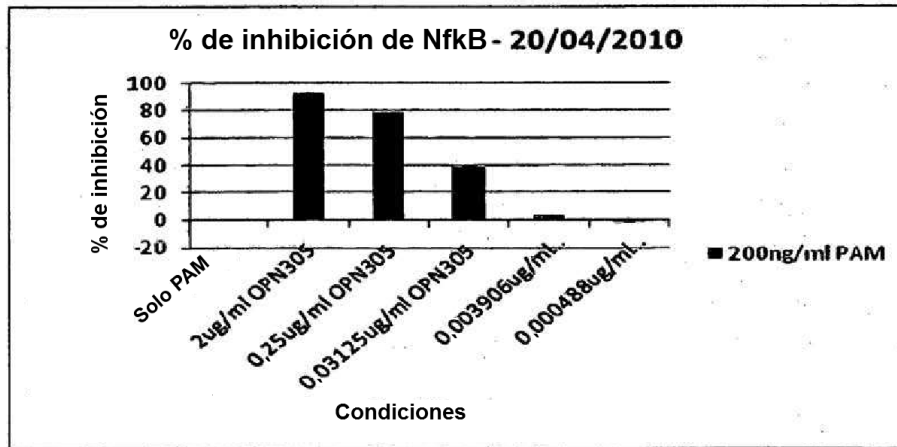


Figura 21A, B

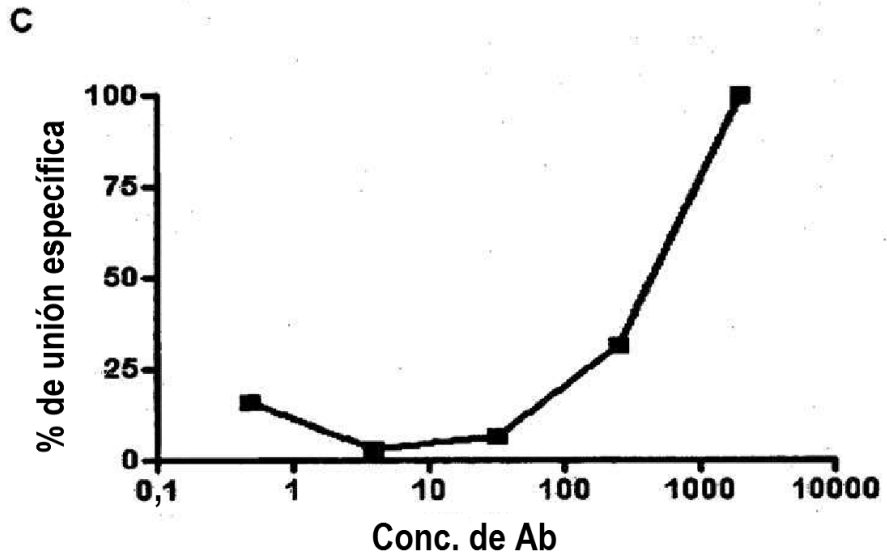


Figura 21C

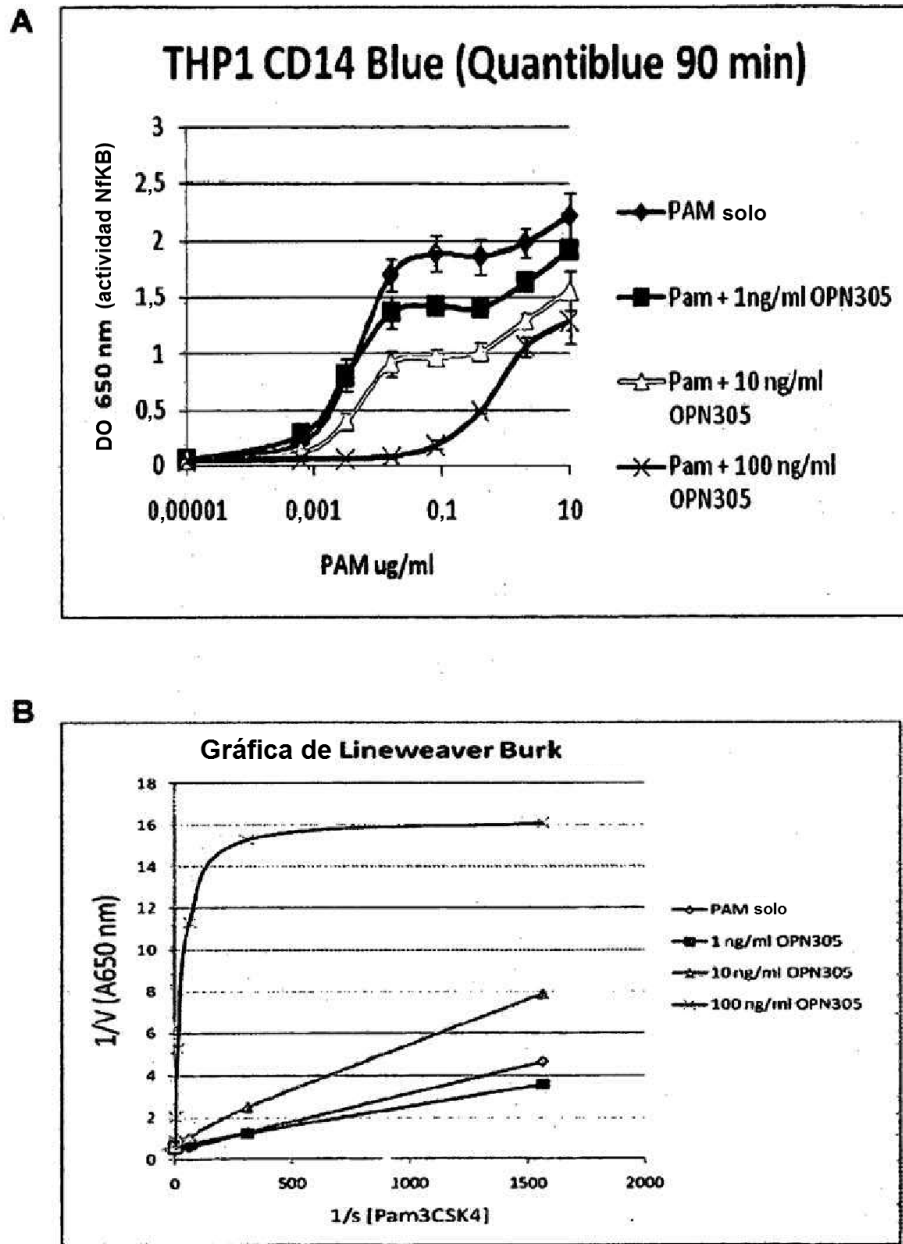


Figura 22

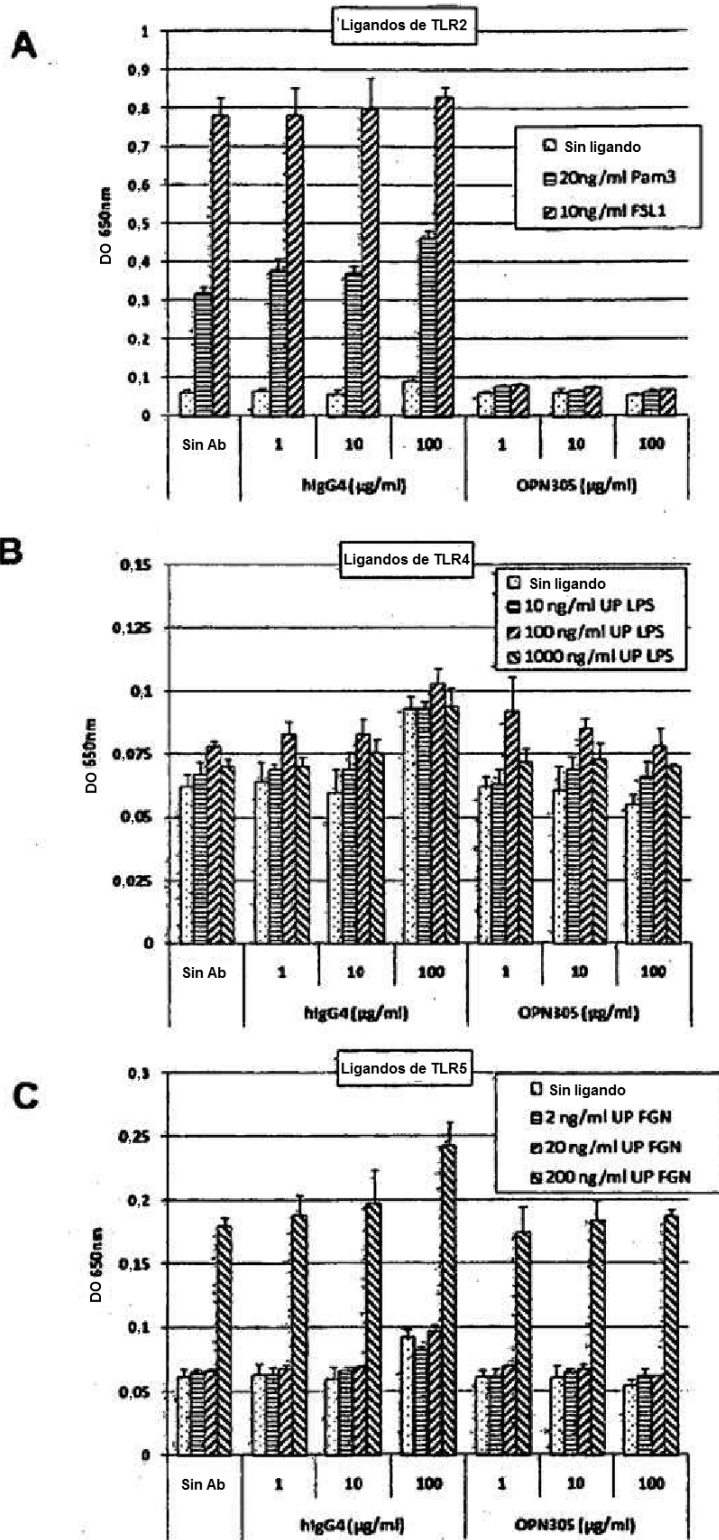


Figura 23

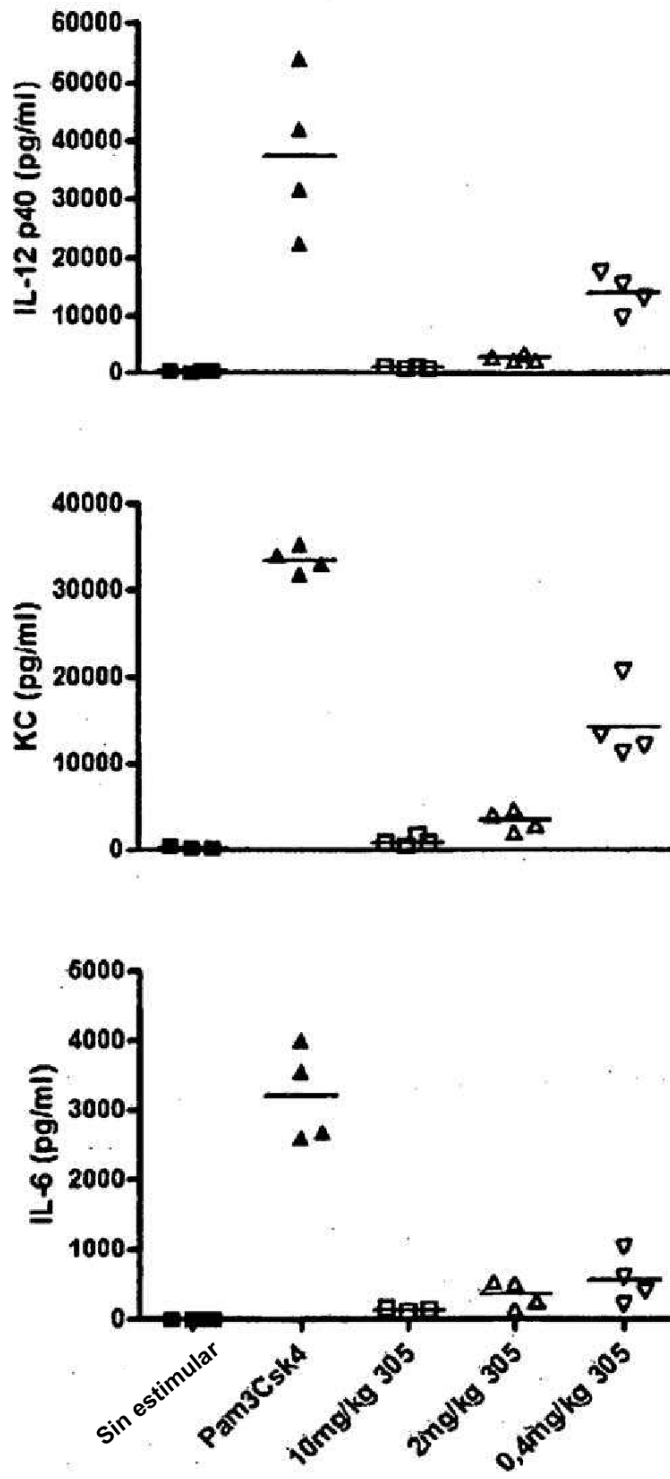


Figura 24

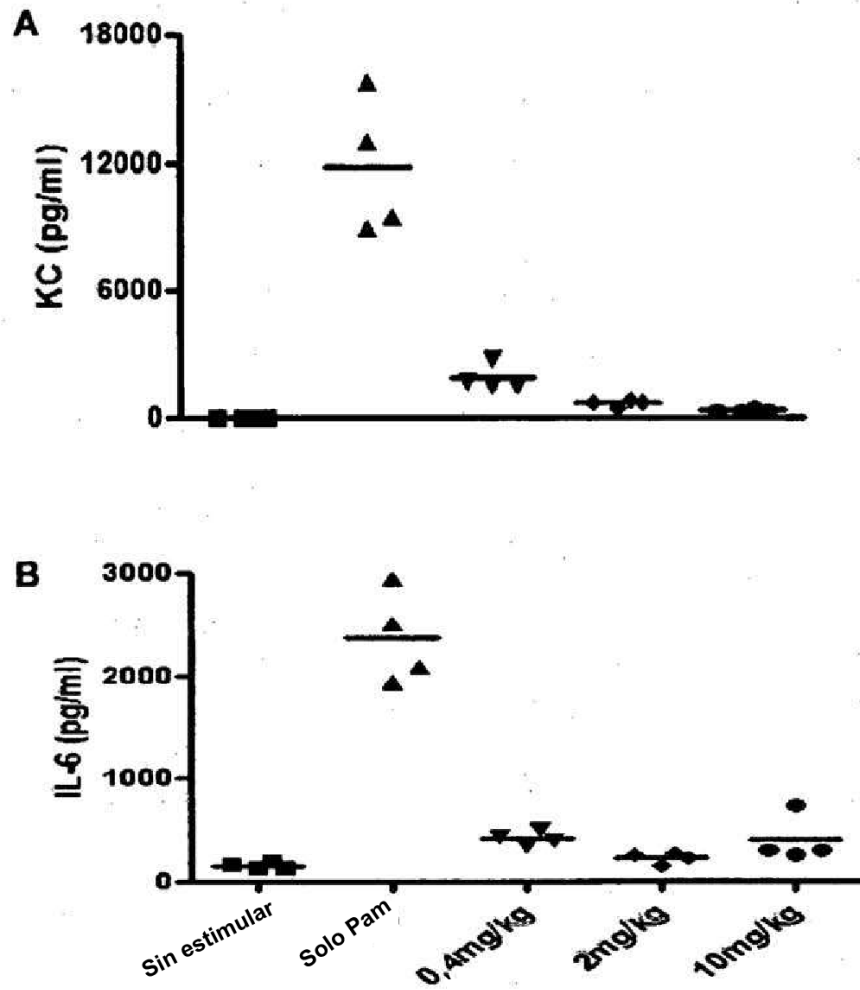


Figura 25

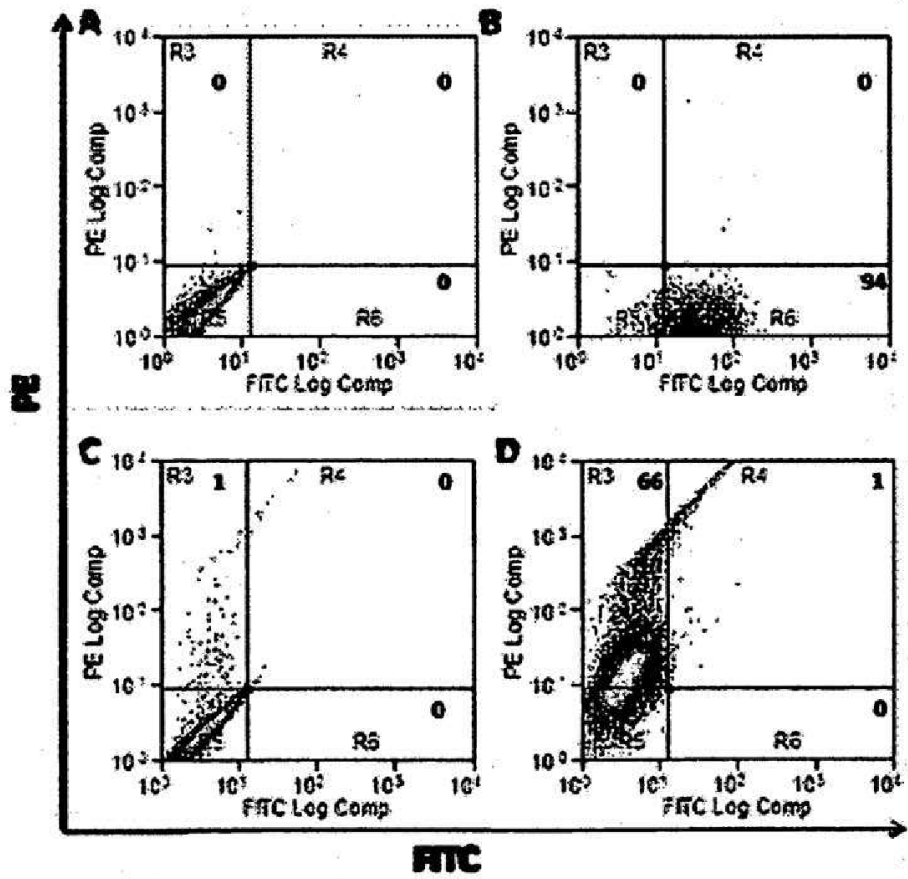


Figura 26

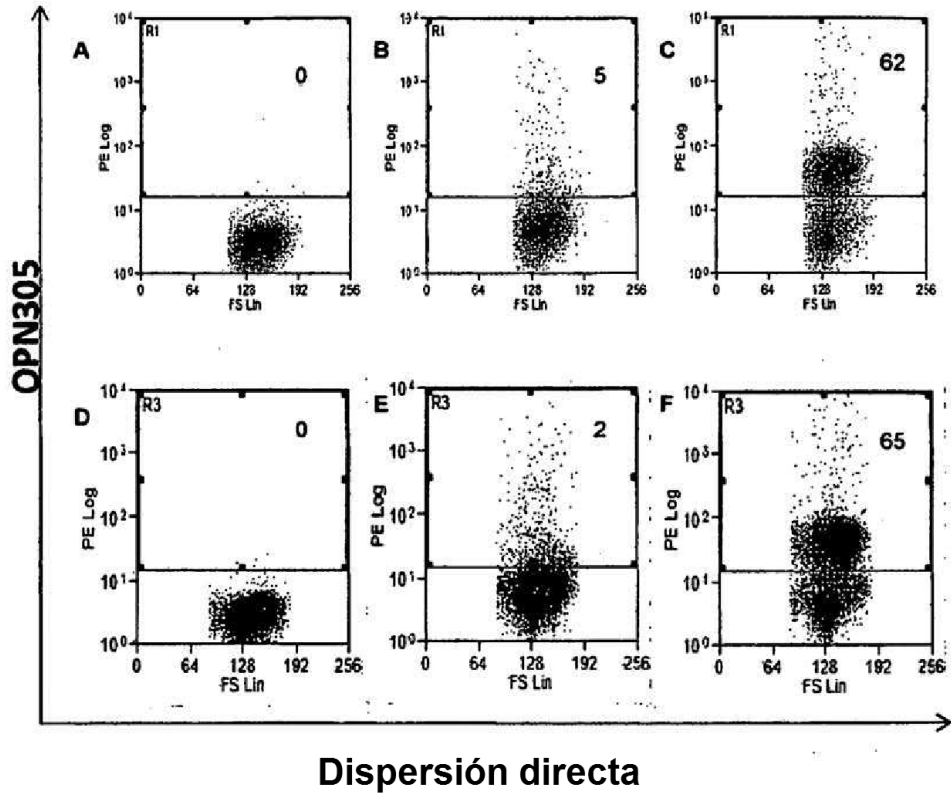


Figura 27