

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 095**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10734092 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2451844**

54 Título: **Agentes de unión a TLR3**

30 Prioridad:

10.07.2009 US 224548 P

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**INNATE PHARMA (100.0%)
117, Avenue de Luminy
13009 Marseille, FR**

72 Inventor/es:

**GAUTHIER, LAURENT;
MASSACRIER, CATHERINE;
MOREL, YANNIS y
PATUREL, CARINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 543 095 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

Agentes de unión a TLR3

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), fragmentos de anticuerpos, y derivados de los mismos que se unen específicamente a TLR3, y que opcionalmente modulan adicionalmente, por ejemplo, inhiben, la señalización. La invención también se refiere a células que producen tales anticuerpos; métodos de preparación de tales anticuerpos; fragmentos, variantes y derivados de los anticuerpos; composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos; métodos de uso de los anticuerpos para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y similares.

15 Antecedentes

Las proteínas toll de *Drosophila* controlan el establecimiento del patrón dorso-ventral y se cree que representar un antiguo mecanismo de defensa del huésped. En seres humanos, se cree que TLR es un componente importante de la inmunidad innata. Secuencias de proteínas toll humanas y de *Drosophila* muestran homología sobre la longitud entera de las cadenas de proteína. La familia de receptores del tipo toll humanos comprende diez proteínas de receptor altamente conservadas, TLR1-TLR10. Al igual que toll de *Drosophila*, los TLR humanos son proteínas transmembranarias de tipo I con un dominio extracelular que consiste en un dominio de repetición rica en leucina (LRR) que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y un dominio citoplásmico que es homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina-1 (IL-1) humano. Similar a las vías de señalización para tanto toll de *Drosophila* como el receptor de IL-1, los receptores del tipo toll humanos señalizan mediante la vía de NF- κ B.

Aunque los diferentes TLR de mamífero comparten muchas características y mecanismos de transducción de señales, sus funciones biológicas son muy diferentes. Esto es debido en parte al hecho de que cuatro moléculas adaptadoras diferentes (MyD88, TIRAP, TRIF y TRAF) están asociadas en diversas combinaciones con los TLR y median en diferentes vías de señalización. Además, diferentes ligandos para un TLR pueden activar preferencialmente diferentes rutas de transducción de señales. Además, los TLR se expresan diferencialmente en diversas células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Por consiguiente, la respuesta a un ligando de TLR depende no solo de la vía de señalización activada por el TLR, sino también de la naturaleza de las células en las que se expresa el TLR individual.

El receptor de tipo toll 3 (TLR3) ha recibido una atención considerable como diana terapéutica, ya que la señalización de TLR3 participa en afecciones inflamatorias y autoinmunitarias. La solicitud de patente WO98/50547 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la proteína hTLR3. LeBouteiller et al. (2005) J. Biol. Chem. 280(46): 38133-38145) desvelan el uso de un anticuerpo anti-TLR3 que se une al TLR3 de superficie celular. Se ha expuesto que el anticuerpo C1130 es activador hacia TLR3 y se ha descrito en el documento WO 2007/051164. Los anticuerpos policlonales que inhibieron TLR3 se describieron en Cavassani et al. (2008) J. Exp. Med. 205: 2609-2621. El documento WO 03/106499 y Matsumoto et al. (2003) J. Immunol. 171:3154-3162 describen un anticuerpo correspondiente al clon de anticuerpo TLR3.7 (eBioScience Inc., San Diego), que se informó que se unía e inhibía TLR3 de la superficie celular, pero no TLR3 del compartimento celular o en CD de linaje mielóide. El documento WO 06/060513 describe un anticuerpo C1068 que se informa que inhibe la producción de citocinas en células epiteliales, que se informa que expresan TLR3 sobre la superficie celular. Se ha expuesto que C1068 compete con el anticuerpo TLR3.7 para unirse a TLR3 (véase el documento WO2010/051470). La solicitud de patente PCT WO2010/051470 proporciona anticuerpos anti-TLR3. Se ha expuesto que tales anticuerpos bloquean el ARNbc y se propone que previenen la unión del ARNbc a TLR3. Otros anticuerpos anti-TLR3 para uso en investigación incluyen anticuerpos anti-TLR3 policlonales de R&D Systems Corp., anticuerpo 40C1285 de Abcam y anticuerpos 619F7, 713E4, 716G10, IMG-5631 e IMG-5348, todos de Imgenex. Corp.

Sin embargo, aunque hasta la fecha se han generado algunos anticuerpos anti-TLR3, estos anticuerpos se han previsto generalmente para investigación solo, y no para uso terapéutico. Como se ha descrito adicionalmente en el presente documento, la presente divulgación muestra que entre los anticuerpos anti-TLR3 actualmente disponibles, aunque pueden ser útiles en algunos ámbitos de investigación para hacer observaciones experimentales, no son óptimamente aptos para uso como agentes terapéuticos, por ejemplo, para modular TLR3. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar anticuerpos mejorados dirigidos a TLR3.

60 Resumen de la invención

El alcance de la invención se determina por las reivindicaciones. La información proporcionada en el presente documento que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo para información.

65 En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona novedosas composiciones que comprenden, y métodos de uso de anticuerpos monoclonales, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos, y derivados que

se unen específicamente a TLR3 humano. En un aspecto, los anticuerpos inhiben la señalización de TLR3 sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 a un polipéptido TLR3. En un aspecto, los anticuerpos se unen al TLR3 humano en condiciones ácidas, y en particular en condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimento subcelular acidificado de una célula (por ejemplo, compartimentos de la vía endocítica endosómica, lisosómica). Tales condiciones ácidas se caracterizan generalmente por un pH inferior a aproximadamente pH 6,5, o entre aproximadamente pH 4,5 y 6,5, o aproximadamente pH 5,6.

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos modulan, opcionalmente inhiben, la señalización de TLR3 en un compartimento subcelular acidificado de una célula (por ejemplo, compartimentos de la vía endocítica endosómica, lisosómica).

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos modulan, opcionalmente inhiben, la señalización de TLR3 en una célula dendrítica (CD) (por ejemplo, una CD mielóide, CD derivada de monocitos).

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos pueden opcionalmente caracterizarse por no tener afinidad sustancialmente menor por la unión a TLR3 humano en condiciones ácidas que bajo condiciones neutras, por ejemplo, si la K_D para unirse a TLR3 disminuye no más de 0,2-, 0,3-, 0,4-, 0,5-, 1,0- o 1,5- \log_{10} . Condiciones neutras se caracterizan generalmente por un pH entre 6,6 y 7,4, por ejemplo, un pH ligeramente alcalino de 7,2 encontrado en el citosol de la célula. Opcionalmente, los anticuerpos no tienen afinidad sustancialmente diferente (menor o mayor) por la unión a TLR3 humano en condiciones ácidas que bajo condiciones neutras, por ejemplo, si la K_D para unirse a TLR3 bajo condiciones neutras y ácidas se diferencia no más de 0,2-, 0,3-, 0,4-, 0,5-, 1,0- o 1,5- \log_{10} .

En otros aspectos de la divulgación, la afinidad de unión bivalente de los anticuerpos por TLR3 en condiciones ácidas puede opcionalmente caracterizarse por una K_D media no superior a aproximadamente (es decir, mejor afinidad que) 100, 50, 10, 5 o 1 nanomolar, preferentemente sub-nanomolar u opcionalmente no superior a aproximadamente 300, 200, 100 o 10 picomolar.

En otros aspectos de la divulgación, los anticuerpos inhiben la señalización de TLR3 sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 a un polipéptido TLR3. El ligando de TLR3 será generalmente un ligando distinto de un anticuerpo anti-TLR3 y puede ser un ligando de TLR3 que se produce naturalmente o que no se produce naturalmente, opcionalmente un ligando basado en ARNbc tal como poliAU (ácido poliadenílico:ácido poliuridílico) o poliIC (ácido poliinosínico:policitidílico). En particular, los inventores han establecido que los anticuerpos según la divulgación pueden inhibir la señalización de TLR3 incluso cuando un ligando de TLR3 tal como ARNbc ya está unido al polipéptido TLR3. Los anticuerpos según la divulgación también pueden inhibir la señalización de TLR3 incluso en una condición pre-activada, por ejemplo, en presencia de IFN α . Se cree que los anticuerpos según la divulgación son eficaces para tratar un paciente que tiene una enfermedad autoinmunitaria establecida, por ejemplo, ligando de TLR3 que se produce naturalmente tal como ARNbc y/o la presencia de, y en particular, altos niveles de, IFN α en las células enfermas. Los anticuerpos también tendrán la ventaja de unirse a TLR3, aunque el sitio de unión a ligando de TLR3 esté ocupado por una molécula de ARNbc, permitiendo así posiblemente unión global más ancha.

La presente divulgación muestra que los anticuerpos que se unen a TLR3 humano en condiciones ácidas tienen una fuerte capacidad para modular, particularmente inhibir, la señalización de TLR3 en células (células dendríticas mieloides (CDM d); CD derivadas de monocitos (CDM o)) que expresan TLR3 únicamente o principalmente en sus compartimentos citoplásmicos, y principalmente en compartimentos de la vía endocítica (por ejemplo, endosomas). Los anticuerpos se unen a una región en TLR3 que no participa en la unión a ARNbc, y los anticuerpos no previenen que el ARNbc se una a TLR3 en condiciones ácidas. Las composiciones y métodos son útiles para un multitud de aplicaciones, y son particularmente muy adecuados para modular la señalización de TLR3 (por ejemplo, *in vivo*) si el TLR3 citosólico (por ejemplo, localizado en el compartimento de la vía endocítica) es elegido como diana. La modulación de la señalización de TLR3 citosólico puede ser útil para tratar o prevenir una enfermedad para la que es beneficiosa la modulación de la señalización de TLR3 en CD u otras células que expresan TLR3 en compartimentos citosólicos ácidos (por ejemplo, en endosomas). Por ejemplo, la inhibición de la señalización de TLR3 en CD (por ejemplo, como se ha observado por la inhibición de la producción de citocinas por la CD) puede usarse en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios, ya que las CD tienen una capacidad bien documentada de captar antígenos de células apoptóticas o necróticas (Albert et al. (2004) Nat. Rev. Immunol. 4: 223-231), que incluye durante la necrosis de tejidos durante inflamación aguda (Cavassani et al. (2008). Opcionalmente, los anticuerpos inhiben la señalización de TLR3, por ejemplo, inhiben la producción de citocinas (por ejemplo, IP10) inducida por la estimulación de un receptor TLR3 por un ligando de TLR3.

Los endosomas y lisosomas son compartimentos unidos a la membrana dentro de las células, forman parte de la vía endocítica y son normalmente ácidos debido a la acción de una ATPasa de bombeo de protones de la membrana endosómica. Las primeras mediciones del pH lisosómico *in situ* encontraron un pH de 4,7-4,8 en macrófagos; se determinó que el pH de endosomas de fibroblastos que participaron en la endocitosis mediada por receptor era aproximadamente 5,5. Estudios previos de TLR3 identificaron que se expresaba en el citosol en CD derivadas de monocitos y que probablemente unió su ligando en compartimentos subcelulares de la vía endocítica (Matsumoto et al. (2003) J. Immunol. 171:3154-3162). Ya se ha informado que TLR3 se expresa en el compartimento endosómico de las células en células dendríticas, astrocitos, macrófagos, linfocitos T, células epiteliales, fibroblastos y

hepatocitos, aunque también se ha encontrado TLR3 sobre la superficie celular, particularmente sobre células epiteliales, y en algunos casos de inflamación también sobre macrófagos (Cavassani et al. 2008, arriba). Se ha mostrado que la acidificación endosómica tiene una función en la señalización de TLR3, ya que el tratamiento con cloroquina, un inhibidor de la acidificación endosómica, inhibe la señalización de TLR3 en CD. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento que se unen a TLR3 en condiciones ácidas correspondientes a un compartimento endosómico acidificado (por ejemplo, pH de aproximadamente 5,6, o inferior a aproximadamente 6,5) tienen la ventaja de permitir la eficaz unión de alta afinidad a, y opcionalmente adicionalmente modulación de, TLR3 en compartimentos endosómicos en comparación con anticuerpos que pierden su afinidad en condiciones ácidas y así pueden ejercer sus efectos más sobre el TLR3 de la superficie celular. Los anticuerpos ejemplificados tienen fuerte actividad inhibidora sobre TLR3 en CD que se sabe que expresan TLR3 principalmente en compartimentos citosómicos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al TLR3 humano e inhiben la señalización de TLR3, por ejemplo, inhiben la producción de citocinas inducida por la estimulación de un receptor TLR3 por un ligando de TLR3, sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 (por ejemplo, un ligando de TLR3 natural o sintético, un ligando basado en ácido nucleico, un ARNbc, ARNbc viral, poliIC, poliAU) a un polipéptido TLR3. Cuando los polipéptidos TLR3 se unen por tales anticuerpos, el ARNbc todavía puede unirse a los polipéptidos TLR3, reduciendo el ARNbc disponible para unirse al resto de TLR3 que no se une al anticuerpo y/u otros receptores de ARNbc (es decir, RIG-I, MDA-5, TLR7, etc.), reduciendo así posiblemente efectos secundarios no deseables tales como elevada toxicidad, activación de la cascada de señalización inapropiada, etc., y condiciones resultantes, por ejemplo, inflamación crónica, que surgen de la señalización inducida por el ARNbc. Tales composiciones de anticuerpo y métodos son útiles para una multitud de aplicaciones, particularmente para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la señalización de TLR3, y en vista de su mecanismo de acción, los anticuerpos de la divulgación pueden usarse para anergizar o inhibir polipéptidos TLR3. Opcionalmente, el anticuerpo puede caracterizarse por no reducir detectablemente la unión de un ligando ARN bicatenario de TLR3 a un polipéptido TLR3. El anticuerpo también puede o puede no ser capaz de unirse con alta afinidad a TLR3 humano en condiciones ácidas, por ejemplo, en condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimento endosómico acidificado. En una realización, si se busca un anticuerpo que puede inhibir la señalización por TLR3, será ventajoso que un anticuerpo que se une específicamente a TLR3 e inhibe la señalización de TLR3 sin bloquear la unión de un ligando ARN bicatenario de TLR3 a un polipéptido TLR3 pueda adicionalmente ser capaz de unirse a e inhibir TLR3 humano en condiciones ácidas como se describe en el presente documento, y en particular en condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimento endosómico acidificado de una célula.

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con uno cualquiera o cualquier combinación de anticuerpos monoclonales 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, opcionalmente bajo condiciones ácidas y/o neutras. En una realización, un anticuerpo de la divulgación compite para unirse a un polipéptido TLR3, opcionalmente bajo condiciones ácidas y/o neutras, con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 2 y 3 (31C3),
- (b) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 10 y 11 (29H3),
- (c) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 18 y 19 (28F11),
- (d) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 26 y 27 (23C8) y
- (e) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 34 y 35 (34A3).

En un aspecto, el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 31C3 y 29H3; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 31C3 y 23C8; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 31C3 y 28F11; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 31C3 y 34A3. En una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 29H3 y 23C8; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 29H3 y 28F11; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 29H3 y 34A3. En una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 23C8 y 28F11; en una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 23C8 y 34A3. En una realización el anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con anticuerpos 28F11 y 34A3.

En un aspecto, el anticuerpo de la divulgación comprende una cadena ligera que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera (LCDR1) seleccionada de SEC ID N°: 61, 64 y 65;
- (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera (LCDR2) seleccionada de SEC ID N°: 62, 66 y 67; y/o
- (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera (LCDR3) seleccionada de SEC ID N°: 63, 68, 69 y 70.

En un aspecto, el anticuerpo de la divulgación comprende una cadena pesada que comprende:

- 5 (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) seleccionada de SEC ID N°: 71 a 76;
 (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) seleccionada de SEC ID N°: 77 a 81;
 y/o
 (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) seleccionada de SEC ID N°: 82 a 85.

En un aspecto, el anticuerpo de la divulgación está seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 (a) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 4, 5 y 6, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 7, 8 y 9, respectivamente;
 (b) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 12, 13 y 14, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR
 15 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 15, 16 y 17, respectivamente;
 (c) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 20, 21 y 22, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR
 20 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 23, 24 y 25, respectivamente;
 (d) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 28, 29 y 30, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR
 25 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 31, 32 y 33, respectivamente; y
 (e) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 36, 37 y 38, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR
 30 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 39, 40 y 41, respectivamente;
- opcionalmente en el que uno, dos, tres o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo se une al mismo epítotope de TLR3 que uno cualquiera o cualquier combinación de anticuerpos monoclonales 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. En otra realización, el anticuerpo
 35 comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 31C3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 29H3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 23C8. En otra realización, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 28F11. En otra realización, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 34A3. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una, dos o las tres CDR de la
 40 secuencia de la región variable de la cadena ligera de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, y/o una cadena pesada que comprende una, dos o las tres CDR de la secuencia de la región variable de la cadena pesada 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. En otra realización, el anticuerpo es 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 o un fragmento o derivado del mismo, opcionalmente fusionado con una región Fc humana. Los anticuerpos 29H3.7 y 31C3.1 se han depositado en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue de Docteur
 45 Roux, F-75724 París el 3 de julio de 2009, bajo el número CNCM I-4187 y CNCM I-4186, respectivamente. Las regiones de unión al antígeno de los anticuerpos 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 también se desvelan en SEC ID N° 2 a 41.

En un aspecto de la divulgación, la cadena ligera de un anticuerpo según la presente divulgación se obtiene de o
 50 está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos derivada de un reordenamiento de genes de VL seleccionado de VK 19-14, VK aq4, VK 12-41 y VK 12-44 para el gen V y JK2 para el gen J.

En un aspecto de la divulgación, la cadena pesada de un anticuerpo según la presente divulgación se obtiene de o
 55 está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos derivada de un reordenamiento de genes de VH seleccionado de VH36-60.a1.85, VH L558.1 y VH J558.2 para el gen V y JH4 o JH2 para el gen J.

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo tiene una o más CDR de la secuencia seleccionada del grupo que
 60 consiste en SEC ID N°: 4 a 9, 12 a 17, 20 a 25, 28 a 33, 36 a 41, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituidos con un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une específicamente a TLR3, en el que el anticuerpo tiene una o más de las siguientes propiedades:

- 65 a. tiene una afinidad subnanomolar por un polipéptido TLR3 a un pH ácido, por ejemplo, a pH inferior a aproximadamente 6,5, o entre aproximadamente 4,5 y 6,5 o aproximadamente pH 5,6; o
 b. puede inhibir la señalización de TLR3 en presencia de un ligando de TLR3; o

- c. puede inhibir la señalización de TLR3 en un antecedente inflamatorio, por ejemplo, en presencia de citocinas inflamatorias tales como IFN α ; o
- d. compite para unirse a un polipéptido TLR3 con 31C3, 29H3, 28F11, 23C8 o 34A3;
- e. no compite con ARNbc para unirse a un polipéptido TLR3.

5 En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades anteriormente enumeradas (a) y (b); (a), (b) y (c); (a), (b), (c) y (d); o (a), (b), (c), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (a) y (c); (a), (c) y (d); o (a), (c), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (a) y (d); (a) y (e); o (a), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (b) y (c); (b), (c) y (d); o (b), (c), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (b) y (d); (b) y (e); o (b), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (c) y (d); (c) y (e); o (c), (d) y (e). En una realización, el anticuerpo tiene las propiedades (d) y (e). En otra realización, el anticuerpo tiene adicionalmente cualquiera de las propiedades de los anticuerpos anti-TLR3 descritos en el presente documento.

15 En otra realización, el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones en el presente documento puede ser internalizado por una célula que expresa el polipéptido TLR3 sobre su superficie.

20 En un aspecto de la divulgación, las secuencias de aminoácidos enumeradas en SEC ID comprenden una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos. En otra realización, en cualquier aspecto de la divulgación, la realización puede englobar una secuencia de aminoácidos que puede tener al menos el 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos en una SEC ID N^o particular.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-TLR3 monoclonal que tiene la misma especificidad epitópica que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 31C3, 29H3, 28F11, 23C8 y 34A3.

30 En un aspecto, el anticuerpo es quimérico, por ejemplo, contiene una región constante no murina, opcionalmente una humana. En una realización, el anticuerpo es humano o humanizado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. En otra realización, el anticuerpo no se une sustancialmente a otros TLR humanos (por ejemplo, TLR4).

35 En un aspecto de la divulgación, el isotipo del anticuerpo es IgG, opcionalmente IgG1 o IgG3. En una divulgación el anticuerpo comprende un dominio Fc o es de un isotipo que se une por Fc γ R.

40 En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, diacuerpos, fragmento de anticuerpo monocatenario, o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpos diferentes. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo no comprende un dominio Fc o es de un isotipo que no está sustancialmente unido por Fc γ R. En una divulgación, el anticuerpo es de un isotipo IgG4 o IgG2. Como se demuestra en los ejemplos, los fragmentos F(ab')₂ de los anticuerpos de la presente divulgación retuvieron su capacidad para modular la señalización de TLR3 en CD y así fueron captados por CD a pesar de su ausencia de dominio Fc. Generalmente se ha pensado previamente que los anticuerpos entrarán en la vía endosómica en CD al menos en parte por la captación mediada por receptores de Fc (CD humanas expresan varios tipos de receptores de Fc γ (Fc γ R), que incluyen tipo I (Fc γ RI, CD64) y tipo II (Fc γ RII, CD32)). El hallazgo de que los isotipos y formatos que no se unen a Fc γ R pueden modular TLR3 en CD permite desarrollar anticuerpos que retienen características deseadas sin un riesgo de inducir agotamiento no deseado (por ejemplo, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por Fc γ R) de células que expresan TLR3. Por ejemplo, pueden usarse isotipos IgG4 u otros isotipos de IgG modificados para reducir su unión a Fc γ R para sus ventajosas propiedades farmacológicas tales como semivida en suero, mientras que se modula la señalización de TLR3, en, por ejemplo, una CD, sin inducir la muerte de la célula. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-TLR3 inhibe la señalización de TLR3 y comprende una región constante de isotipo IgG4 o IgG2. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo anti-TLR3 inhibe la señalización de TLR3 y comprende una región constante que no se une sustancialmente a Fc γ R.

En otro aspecto, el anticuerpo está conjugado o unido covalentemente a un resto detectable o tóxico.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula, por ejemplo, un hibridoma o célula huésped recombinante, produciendo un anticuerpo anti-TLR3 de la divulgación. En un aspecto, la célula es el clon 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona un hibridoma que comprende: a) un linfocito B de un huésped mamífero no humano que se ha inmunizado con un antígeno que comprende el epítipo de TLR3 específicamente reconocido por el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, fusionado con b) una célula inmortalizada, en el que el hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al epítipo. En uno de estos aspectos, el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Opcionalmente, la célula produce un anticuerpo que tiene la región de unión al antígeno del anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prueba de un anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: probar un anticuerpo para determinar si:

- a) inhibe la señalización de TLR3, opcionalmente sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 (por ejemplo, ARNbc) a un polipéptido TLR3, y/o
- b) compite para unirse a un polipéptido TLR3 con el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, y/o
- c) se une a TLR3 humano en condiciones ácidas, y en particular en condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimento subcelular acidificado de una célula de una célula, por ejemplo, aproximadamente pH 5,6, entre aproximadamente pH 4,5 y aproximadamente 6,5; opcionalmente en el que la afinidad por TLR3 en condiciones ácidas no es sustancialmente diferente, por ejemplo, reducida, en comparación con la unión bajo condiciones neutras.

Opcionalmente, el método comprende probar un anticuerpo según las subetapas (a) y (b), subetapas (a) y (c), subetapas (b) y (c) o subetapas (a), (b) y (c).

Opcionalmente, el método comprende además una etapa de seleccionar el anticuerpo si se determina que inhibe la señalización de TLR3, si se determina que compite para unirse a un polipéptido TLR3 con el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, y/o si se determina que se une a TLR3 humano en condiciones ácidas y/o sin una reducción en la afinidad en comparación con condiciones neutras. Opcionalmente, el anticuerpo se prueba adicionalmente para su capacidad para modular, por ejemplo, inhibir, la señalización de TLR3 en una célula dendrítica, y se selecciona si se determina que el anticuerpo modula la señalización de TLR3 en una CD. Opcionalmente, el anticuerpo así seleccionado se selecciona para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo, un anticuerpo que inhibe la señalización de TLR3 se usará en trastornos inflamatorios y autoinmunitarios). Opcionalmente, se produce una cantidad de anticuerpo así seleccionada (por ejemplo, en una célula huésped recombinante).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de producción de un anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en un sujeto mamífero, particularmente en un sujeto humano, comprendiendo dicho método las etapas de generar una pluralidad de anticuerpos (por ejemplo, inmunizando un mamífero no humano con un inmunogén que comprende un polipéptido TLR3); y seleccionar un anticuerpo de dicha pluralidad que:

- a) inhibe la señalización de TLR3, opcionalmente sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 (por ejemplo, ARNbc) a un polipéptido TLR3, y/o
- b) compite para unirse a un polipéptido TLR3 con el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, y/o
- c) se une a TLR3 humano en condiciones ácidas, y en particular en condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimento subcelular acidificado de una célula de una célula, por ejemplo, aproximadamente pH 5,6, entre aproximadamente pH 4,5 y aproximadamente 6,5; opcionalmente en el que la afinidad por TLR3 en condiciones ácidas no es sustancialmente diferente, por ejemplo, reducida, en comparación con la unión bajo condiciones neutras.

Opcionalmente, el método comprende seleccionar un anticuerpo según las subetapas (a) y (b), subetapas (a) y (c), subetapas (b) y (c) o subetapas (a), (b) y (c). Opcionalmente, el método comprende además seleccionar un anticuerpo que tiene la capacidad para modular, por ejemplo, inhibir, la señalización de TLR3 en una célula dendrítica, y se selecciona si se determina que el anticuerpo modula la señalización de TLR3 en una CD.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prueba de un anticuerpo que comprende: a) proporcionar un anticuerpo de prueba; y b) evaluar si dicho anticuerpo de prueba induce una disminución en la expresión de TLR3 en la superficie de células, c) si dicho anticuerpo no induce una disminución en la expresión de TLR3 en la superficie de células, seleccionar dicho anticuerpo de prueba como candidato para el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cualquiera de las enfermedades desveladas en el presente documento).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prueba de un anticuerpo que comprende: a) proporcionar un anticuerpo de prueba; b) evaluar la afinidad de unión de dicho anticuerpo de prueba en condiciones ácidas, por ejemplo, a un pH de 5,6; y c) si dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión en condiciones ácidas (por ejemplo, afinidad subnanomolar, disminución no sustancial en la afinidad en comparación con en condiciones neutras, etc.), seleccionar dicho anticuerpo de prueba como candidato para el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prueba de un anticuerpo que comprende: a) proporcionar un anticuerpo de prueba; b) evaluar si dicho anticuerpo de prueba puede unirse a la proteína TLR3 en presencia de un ligando de TLR3, por ejemplo, ARNbc; y c) si dicho anticuerpo puede unirse a la proteína TLR3 en presencia de un ligando de TLR3, seleccionar dicho anticuerpo de prueba como candidato para el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de selección de un anticuerpo que comprende: a) proporcionar un anticuerpo de prueba; b) evaluar si dicho anticuerpo de prueba puede unirse a la proteína TLR3 en

presencia de citocinas inflamatorias, es decir, IFN α ; y c) seleccionar dicho anticuerpo de prueba como candidato para el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prueba de un anticuerpo que comprende: a) proporcionar un anticuerpo de prueba; b) evaluar si dicho anticuerpo de prueba puede ser internalizado, por ejemplo, por una célula que expresa TLR3; y c) si dicho anticuerpo puede ser internalizado, preferentemente en el que el anticuerpo se internaliza rápidamente, por ejemplo, en el plazo de 2 horas, seleccionar dicho anticuerpo de prueba como candidato para el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, la enfermedad es un trastorno inflamatorio. En un aspecto, la enfermedad es un cáncer.

En un aspecto, los anticuerpos preparados son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el método comprende además una etapa en la que se evalúa la capacidad de dichos anticuerpos para unirse específicamente a polipéptidos TLR3 humanos. En un aspecto, se evalúa la capacidad de los anticuerpos para unirse a otros miembros de la familia de TLR. En otro aspecto, el método comprende además la etapa de preparar fragmentos o derivados de los anticuerpos monoclonales seleccionados. En un aspecto, los fragmentos o derivados están seleccionados del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂, Fv, diacuerpos, fragmento de anticuerpo monocatenario, anticuerpos multiespecíficos que comprenden múltiples fragmentos de anticuerpos diferentes, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. En otro aspecto, el mamífero no humano es un ratón.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir enfermedad en un paciente que comprende administrar un anticuerpo para TLR3 de la divulgación al paciente. En otro aspecto, el método comprende además la etapa de administrar al paciente un agente terapéutico adicional apropiado, por ejemplo, particularmente cuando el anticuerpo para TLR3 inhibe la señalización de TLR3, un agente adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes inmunomoduladores, corticosteroides, inmunosupresores, antibióticos, agentes antiinflamatorios y similares. Particularmente, cuando el anticuerpo para TLR3 es internalizado por una célula que expresa TLR3 y/o se liga a una toxina o fármaco citotóxico con el fin de eliminar una célula que expresa TLR3 (por ejemplo, una célula cancerosa), puede seleccionarse un agente adicional del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente citotóxico y similares. En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada de autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, infecciones, osteoporosis, cirrosis y septicemia, cáncer u otras enfermedades contempladas en el presente documento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo para TLR3 inhibidor a un paciente en necesidad del mismo. El anticuerpo se administra durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir dicha enfermedad.

En un aspecto, los anticuerpos de la divulgación pueden usarse en ensayos de diagnóstico o más generalmente cualquier ensayo para detectar polipéptidos TLR3 *in vitro*. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método *in vitro* de detección de un polipéptido TLR3 (por ejemplo, en una muestra biológica) que comprende poner un polipéptido TLR3 (por ejemplo, una célula que expresa un polipéptido TLR3, un polipéptido TLR3 purificado, una muestra biológica, etc.) en contacto con un anticuerpo monoclonal de la divulgación, y detectar la unión del anticuerpo al polipéptido TLR3.

Estos aspectos y características y aspectos y características ventajosos adicionales de la divulgación pueden describirse adicionalmente en cualquier parte en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la inhibición de marcadores de activación de TLR3 sobre CD mieloides, Figura 1A: nivel de expresión de CD86, Figura 1B: secreción de IL-6, Figura 1C: secreción de IP-10. Todas las figuras muestran que, en comparación con el control, el anticuerpo 31C3 inhibe la respuesta inducida por el ligando de TLR3.

La Figura 2 muestra la inhibición de marcadores de activación de TLR3 sobre CDMd, Figura 2A: nivel de expresión de CD86, Figura 2B: secreción de IP-10. Todas las figuras muestran que, en comparación con el control, el anticuerpo 29H3 inhibe la respuesta inducida por el ligando de TLR3.

La Figura 3 muestra la inhibición de marcadores de activación de TLR3 sobre CD mieloides, comparando fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo 31C3 con anticuerpos 31C3 completos purificados (indicados por "Pur"). Figura 3A: nivel de expresión de CD86, Figura 3B: secreción de IP-10. Las figuras muestran que los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo 31C3 inhiben la respuesta inducida por el ligando de TLR3, además de anticuerpos 31C3 completos purificados.

La Figura 4 muestra la inhibición de marcadores de activación de TLR3 sobre CDMd, comparando fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo 29H3 con anticuerpos 29H3 completos purificados (indicados por "Pur"). Figura 4A: nivel de expresión de CD86, Figura 4B: secreción de IP-10. Las figuras muestran que los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo 29H3 inhiben la respuesta inducida por el ligando de TLR3, además de anticuerpos 29H3 completos purificados.

La Figura 5 muestra una comparación de que la afinidad de unión que los anticuerpos según la presente divulgación tienen una unión más fuerte por el chip de TLR3 que los anticuerpos comercialmente disponibles.

La Figura 6 muestra la unión de los anticuerpos según la divulgación sobre un chip de TLR3 en presencia o en ausencia de poliAU, un ligando para receptores TLR3. La figura muestra que la unión de los anticuerpos de la divulgación no bloquea la unión del ARNbc al sitio de fijación del ARNbc de TLR3.

La Figura 7 muestra que la presencia de 29H3 sobre el chip de TLR3 bloquea la unión de 31C3 y viceversa. Estos resultados tienden a mostrar que ambos anticuerpos compiten por un solapamiento o epítoto altamente similar.

La Figura 8 muestra mapas de superficie molecular de los dominios extracelulares de la proteína TLR3 humana, generada por modelado informático.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo para la inhibición de la señalización de TLR3 en una actividad del gen indicador basada en luciferasa (293T-TLR3-ISRE), en el que las veces de aumento en luciferasa se indican en función de la dosis de poliAU. Brevemente, se usaron agonistas de TLR3 de ARNbc para inducir la señalización de TLR3 en el ensayo indicador en presencia del anticuerpo anti-TLR3 31C3 y se evaluó la señalización de TLR3. El anticuerpo 31C3 inhibió fuertemente la señalización de TLR3 en un modo dependiente de la dosis, en comparación con un anticuerpo anti-TLR3 de control que no tiene actividad inhibitoria de TLR3.

La Figura 10A muestra la inhibición dependiente de la dosis de la señalización de TLR3 usando un ensayo de luciferasa de 293T-TLR3, con el anticuerpo comercial TLR3.7 (puntos negros), anticuerpos 28F11 (triángulos blancos), 23C8 (cuadrados blancos) y 31C3 (cuadrados negros) según la divulgación, en comparación con un control (sin Ab: puntos blancos). La Figura 10B muestra los mismos resultados en un ensayo que compara anticuerpos 31C3 (cuadrados negros), 23C8 y 34A3 (triángulos negros).

La Figura 11 muestra el efecto de los anticuerpos anti-TLR331C3 (cuadrados blancos) o 23C8 (cuadrados rellenos negros) en diferentes condiciones en comparación con sin anticuerpo (puntos negros). La secreción de IP-10 se indica en ng/ml en la ordenada, la dosis de ARNbc añadida se indica en µg/ml en el eje. La Figura 11A representa la inhibición de la señalización de TLR3, en las condiciones estándar (sin preactivación). La Figura 11B representa la inhibición de la señalización de TLR3, con una pre-estimulación con poliAU. La Figura 11C representa la inhibición de la señalización de TLR3 con una pre-estimulación con IFN α .

La Figura 12 muestra los resultados de los ensayos cinéticos. La Figura 12A representa la secreción de IP-10 en ng/ml (dependiendo de la dosis de poliAU) para el anticuerpo 31C3, la Figura 12B representa los resultados para el anticuerpo 23C8. El mAb para TLR3 se añade en el medio tanto 1 h 30 antes (cruces negras), junto con (negro más "+"), o 1 h 30 después (cuadrados blancos) del ARNbc, el ARNbc solo (puntos negros) se proporciona como control positivo.

La Figura 13 muestra el reconocimiento específico de TLR3 humano por el mAb 31C3 en células que expresan TLR3, *in vitro*. El perfil del histograma para la tinción de FACS intracelular con el mAb 31C1 se muestra para células de control HEK 293T y células 293T transfectadas con TLR3 humano. Sin teñir representa el intervalo de intensidad de fluorescencia obtenido con el isotipo de control IgG1

La Figura 14 muestra la inhibición de los marcadores de activación inducidos por TLR3 y la secreción de citocinas sobre CD mieloides, Figura 14A: secreción de IP-10, Figura 14B: nivel de expresión de CD86. Todas las figuras muestran que, en comparación con el control, el anticuerpo 31C3 (puntos negros), 28F11 (triángulos negros) y 23C8 (cuadrados negros) (aquí mostrado a una dosis de 50 µg/ml) inhibe la respuesta inducida por el ligando de TLR3.

La Figura 15A y 15B muestran la afinidad de unión de los anticuerpos según la divulgación. La Figura 15A muestra que los anticuerpos según la presente divulgación tienen una unión más fuerte por el chip de TLR3 que los anticuerpos comercialmente disponibles (es decir, TLR3.7). La Figura 15B muestra la unión de los anticuerpos según la divulgación sobre un chip de TLR3 cuando dicho chip se ha saturado previamente con el anticuerpo 31C3. Una comparación de niveles de unión como se expone en las Figuras 15A y 15B enfatiza que los anticuerpos según la divulgación tienen una unión alterada a hTLR3 cuando el chip se ha saturado previamente con el anticuerpo 31C3, por el contrario, el anticuerpo TLR3.7 comercial retiene el mismo nivel de unión en presencia o en ausencia del anticuerpo 31C3.

La Figura 16A y 16B muestran la unión de los anticuerpos 28F11, 34A3 y 23C8 según la divulgación sobre un chip de TLR3 en presencia o en ausencia de poliAU, un ligando para receptores TLR3. Las figuras muestran que la unión de los anticuerpos de la divulgación no bloquea la unión de ARNbc al sitio de fijación del ARNbc de TLR3.

La Figura 17 muestra la unión del anticuerpo 34A3, tanto solo sobre rhTLR3 (línea en negrita) como sobre un chip saturado con 31C3 (línea de puntos). La figura muestra que los dos anticuerpos compiten con 31C3 para unirse a hTLR3.

La Figura 18 muestra los árboles filogenéticos de las CDR de los anticuerpos según la divulgación. La Figura 18A muestra el árbol filogenético para las CDR de las cadenas ligeras y la Figura 18B muestra el árbol filogenético para las CDR de las cadenas pesadas. Las figuras muestran que hay una alta homología de CDR entre los anticuerpos 28F11 (28,2), 31C3 (31) y 23C8(23), y que 23H3 (29) y 34A3 (34) tienen más diferencias en las secuencias de aminoácidos.

La Figura 19A y B muestran la inhibición de marcadores de activación de TLR3 sobre CD mieloides por el anticuerpo 34A3. Figura 19A: secreción de IP-10, Figura 19B: secreción de IL-6. Todas las figuras muestran que, en comparación con el control (sin Ab - puntos blancos) y 31C3 (cuadrados negros, como control positivo), el anticuerpo 34A3 (triángulos negros) inhibe la respuesta inducida por el ligando de TLR3.

La Figura 20 muestra el análisis de FACS de ensayos de internalización como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 20A representa el control negativo, que representa la fluorescencia estándar de las células 293T-ISRE/TLR3 en ausencia de un anticuerpo que se liga a las proteínas TLR3. La Figura 20B es el control positivo, que indica el nivel de expresión de TLR3 en líneas celulares 293T-ISRE/TLR3. La Figura 20C y D representan la proporción de proteínas TLR3 acopladas al anticuerpo 31C3 después de 24 h o 2 h de incubación, respectivamente. La Figura 20E y 20F, que muestran una fluorescencia similar a la Figura 20B, confirman que la

unión de TLR3 por el anticuerpo 31C3 no modula por disminución la expresión de TLR3 sobre líneas celulares 293T-ISRE/TLR3.

La Figura 21A y 21B muestran la unión de los anticuerpos 28F11, 34A3 y 23C8 según la divulgación sobre un chip de TLR3 en presencia o ausencia de poliAU, un ligando para receptores TLR3. Las figuras muestran que la unión de los anticuerpos de la divulgación no bloquea la unión de ARNbc al sitio de fijación del ARNbc de TLR3.

Descripción detallada de la invención

Introducción

La presente divulgación proporciona novedosos métodos para producir y usar anticuerpos y particularmente anticuerpos que modulan TLR3 adecuados para la profilaxis y tratamiento de trastornos tales como autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, cirrosis, osteoporosis, infección, cánceres y septicemia. Anticuerpos, derivados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos y células que los producen están englobados, ya que son métodos de producción de los mismos y métodos para tratar o diagnosticar pacientes usando los anticuerpos y compuestos.

Aunque se desea alta afinidad en los anticuerpos, generalmente todos los anticuerpos informados por tener afinidades en el intervalo picomolar alto a nanomolar bajo han sido madurados por afinidad *in vitro*. La bibliografía científica ha propuesto que hay un techo de afinidad *in vivo* a 100 pM y que éste podría subir debido a que los anticuerpos productores de linfocitos B con afinidades por el antígeno por encima del techo estimado no tendrían ventaja selectiva durante respuestas inmunitarias normales. Sin embargo, existen ejemplos de anticuerpos de alta afinidad, que incluyen el anticuerpo anti-TNF-alfa "TSK114" que se une a TNF-alfa humano con una afinidad de unión (K(D)) de aproximadamente 5,3 pM, que se estableció que era aproximadamente 1.000 y 100 veces superior a aquella de los mAb infliximab (Remicade) y adalimumab (Humira) clínicamente relevantes (Song et al. (2008) Exp. Mol. Med. 40(1): 35-42. Es posible que la obtención de anticuerpos de alta afinidad dependa del antígeno; además, los anticuerpos para TLR3 disponibles hasta la fecha han mostrado en el mejor de los casos afinidad nanomolar. Sin embargo, los presentes anticuerpos anti-TLR3 demostraron afinidad muy alta (de hasta 10 picomolar y mejor que 100 picomolar, que incluye para dos anticuerpos que mantuvieron tal afinidad a condiciones tanto neutras como ácidas).

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente y eficientemente a TLR3 en condiciones ácidas correspondientes a aquellas encontradas en un compartimento endosómico acidificado. Entre los numerosos anticuerpos evaluados, emergieron ciertos anticuerpos que retuvieron la unión a TLR3 a altas afinidades en condiciones ácidas, mientras que otros anticuerpos tales como aquellos disponibles comercialmente y otros seleccionados para la unión a TLR3 o modulación de TLR3 perdieron afinidad a pesar de mostrar inicialmente mayor afinidad (por ejemplo, 2-log_{10} mayor) por TLR3, y/o tuvieron baja afinidad incluso bajo condiciones neutras. Las condiciones ácidas usadas fueron pH 5,6, que es similar al observado en un compartimento endosómico acidificado, correspondiente a las condiciones bajo las que se cree que tiene lugar la señalización de TLR3 en afecciones inflamatorias.

Las condiciones ácidas son generalmente conocidas por afectar la estructura de proteínas, además de por afectar las interacciones proteína-proteína. Se sabe, por ejemplo, que los péptidos de clase II del MHC que no se unen a otros péptidos son rápidamente degradados en las condiciones ácidas del endosoma. Sin embargo, en el presente caso, los anticuerpos que pierden su alta afinidad de unión a TLR3 inmovilizado en condiciones ácidas de pH 5,6 se habían purificado previamente en condiciones ácidas (pH 3). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, esto sugiere que la pérdida de afinidad de unión surgió no de la inestabilidad inherente (degradación) del anticuerpo a condiciones ácidas, sino de modificaciones en la interacción entre los anticuerpos y sus antígenos diana.

Se cree que las modificaciones en las interacciones de anticuerpo-TLR3 que surgen de cambios en el pH afectan las interacciones del ARNbc con TLR3, ya que el ligando de TLR3 poli(I-C) se une y activa TLR3 solo a pH ácido. Los estudios han informado que poli(I-C) (y otro ARNbc) se unen a TLR3 en una región de TLR3 de potencial electrostático positivo a pH neutro que puede experimentar un cambio en el potencial electrostático en condiciones ácidas (es decir, condiciones ácidas en el intervalo de pH 4,5 a 6,5, o aproximadamente 5,6). Se cree que los presentes anticuerpos, sin embargo, se unen al epítipo que no experimenta cambio sustancial en el potencial electrostático (o experimentan menos cambio que, por ejemplo, una región de potencial electrostático positivo) cuando las condiciones se acidifican de forma que la afinidad de unión de los anticuerpos permanezca sustancialmente invariable. Esto puede manifestarse, en un aspecto, en términos de afinidad de los anticuerpos por TLR3, ya que los anticuerpos no tienen afinidad sustancialmente diferente (inferior y/o mayor) por unirse a TLR3 humano en condiciones ácidas que bajo condiciones neutras, por ejemplo, en la que la K_D para unirse a TLR3 se diferencia no más de 0,2-, 0,3-, 0,4-, 0,5-, 1,0- o $1,5\text{-log}_{10}$. La K_D para unirse a TLR3 bajo condiciones ácidas y neutras se diferenció menos de un $0,5\text{-log}_{10}$ para los anticuerpos 31C3 y 29H7. Se cree que el epítipo al que se unen los anticuerpos de la divulgación puede tener un potencial electrostático negativo a pH neutro. Regiones de potencial electrostático negativo, positivo o neutro sobre la superficie de la proteína TLR3 se muestran en la Figura 8 o también se muestran en la Figura 5D de Choe et al. (2005) Science 309:581-585. Mientras que los anticuerpos que inhiben TLR3 interfiriendo con la unión de ligandos ARNbc a TLR3 se unirán probablemente a una región de potencial electrostático positivo o neutro próximo al extremo C sobre la cara libre de glucosilación del TLR3 y, por

tanto, se unen en una región de TLR3 que puede experimentar un mayor cambio en el potencial electrostático, parece que los presentes anticuerpos se unen a una región en TLR3 que no participa en la unión a ligandos ARNbc, mientras que sin embargo retienen la capacidad para inhibir la señalización por la proteína TLR3, por ejemplo, inhibiendo que TLR3 adopte una conformación requerida para transducir por último lugar una señal.

La presente invención también se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales de alta afinidad que inhiben específica y eficazmente la ruta de señalización de TLR3. Los inventores han identificado epítopes presentes sobre TLR3 humano, que incluyen el epítipo reconocido por el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, que son particularmente eficaces en inhibir la señalización de TLR3, e inhibir la liberación de citocinas en respuesta a la estimulación con un ligando de TLR3.

Los anticuerpos de la divulgación que inhiben la señalización de TLR3 serán particularmente útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias, enfermedad inflamatoria y otras enfermedades en las que la inhibición de la señalización de TLR3 es beneficiosa. Las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias surgen de una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. En tanto las enfermedades autoinmunitarias como inflamatorias, la condición surge mediante reacciones anómalas de los sistemas inmunitarios adaptativos o innatos humanos. En autoinmunidad, el sistema inmunitario del paciente se activa contra las propias proteínas del cuerpo. En las enfermedades inflamatorias (incluyendo en la infección que puede conducir a afecciones inflamatorias), es la reacción excesiva del sistema inmunitario, y su posterior señalización aguas abajo (TNF, IFN, etc.), la que produce problemas. Las enfermedades autoinmunitarias resultan de la propagación de linfocitos T y B que reconocen auto-antígenos y median en la destrucción de tejido. Se sospecha desde hace tiempo que las infecciones virales instigan o precipitan abiertamente la autoinmunidad. En Lang et al. (J. Clin. Invest. 116:2456-2463, 2006) se ha demostrado que los virus pueden iniciar daño autoinmune mediante otro mecanismo adicional.

Se ha establecido recientemente que el ARNbc son ligandos para TLR3 (Alexoupoulou et al. (2001), Nature 413: 732-738), también se ha mostrado más recientemente que el ARN liberado de tanto tejido dañado como tejidos podría también actuar de ligandos de TLR3 (Kariko et al., (2004) J. Biol. Chem.). La activación inapropiada de los TLR por sus ligandos ARN endógenos dentro de complejos inmunitarios es casi definitivamente un factor importante que contribuye a la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Artículos recientes sugieren una función de TLR3 en enfermedades inflamatorias (Cavassani et al. 2008), ya que los ligandos de TLR3 amplifican la respuesta hiperinflamatoria observada durante septicemia, o enfermedades de autoinmunidad, tales como artritis reumatoide (Bokarewa et al. (2008) Eur J. Immunol.), lupus eritematoso sistémico (Rahman et al., (2006) Springer Sem. in Immunopathol.) y diabetes (Nature Med. 2005). También se ha informado que el TLR3 puede desempeñar una función perjudicial en infecciones virales tales como virus de la variolovacuna Western Reserve, en las que el TLR3 contribuye a replicación viral, inflamación de pulmón perjudicial y reclutamiento de leucocitos al pulmón, produciendo elevada morbilidad, o en el virus del Nilo occidental (WNV) en el que el TLR3 permite que el virus cruce la barrera hematoencefálica (BBB) y produzca encefalitis letal. Los anticuerpos de la presente divulgación que inhiben TLR3 bajo condiciones de pH correspondientes a aquellas de endosomas (por ejemplo, como en CD mieloides) serán útiles en el tratamiento y prevención de estas afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, las propias infecciones virales y las afecciones (por ejemplo, afecciones autoinmunitarias o inflamatorias) causadas o potenciadas por la infección viral.

Zorde-Khvaleyevsky et al. (2009) Hepatology 49 informan que la proliferación de hepatocitos se aceleró tras la hepatectomía parcial en ausencia de TLR3, mientras que los niveles de IL-6 y receptor de interleucina-6 soluble (sIL-6R) fueron significativamente menores, y adicionalmente después de la hepatectomía parcial la señalización de TLR3 se induce en hepatocitos, produciendo la activación de NF- κ B, y que la presencia de TLR3 activo en células de Kupffer inhibe la activación de NF- κ B. Se encontró, por tanto, que la señalización de TLR3 atenúa la iniciación de la regeneración del hígado; por tanto, los anticuerpos anti-TLR3 de la divulgación pueden usarse en un método de inducción de regeneración del hígado, en particular para tratar y prevenir enfermedades que implican daño del hígado, por ejemplo, cirrosis, o enfermedades que son conocidas por dar lugar a tal daño del hígado tal como alcoholismo, infección por hepatitis B o C o esteatosis hepáticas.

Kim et al. (2009) Immunol. Lett. Informan que TLR3 promueve la osteoclastogénesis en el sinovio de AR estimulando tanto directa como indirectamente monocitos humanos directamente para promover la diferenciación de osteoclastos e induciendo la expresión de RANKL indirectamente en RA-FLS. La expresión de RANKL promueve la diferenciación de osteoclastos en el sinovio de AR, y anticuerpos anti-RANKL (denosumab, Amgen Inc.) son eficaces en el tratamiento de osteoporosis. Los anticuerpos anti-TLR3 de la divulgación pueden, por tanto, ser de uso para tratar y prevenir destrucción inflamatoria del hueso, por ejemplo, osteoporosis, particularmente en pacientes con AR.

Wen et al. (2004) J. Immunol. 172: 3172-3180 sugieren que las enfermedades autoinmunitarias pueden inducirse por un estímulo de tipo viral, e identifican que TLR3 puede mediar en tal inducción. Los resultados demuestran que poliIC, junto con insulina, pero no insulina sola u otros ligandos de TLR (CpG, LPS, PGN), pueden inducir diabetes autoinmune y apoptosis de islotes pancreáticos en un modelo de ratón. Además, TLR3 mostró el mayor nivel de

expresión en todos los individuos, en comparación con otros TLR. Los anticuerpos anti-TLR3 de la divulgación pueden, por tanto, usarse para tratar y prevenir diabetes y autoinmunidad de islotes.

Los anticuerpos de la presente divulgación que se unen a TLR3 en condiciones ácidas generalmente se unirán tanto a TLR3 de la superficie celular como a TLR3 endosómico a alta afinidad, de forma que los anticuerpos serán útiles en cualquier situación (por ejemplo, tratamiento o prevención de enfermedad) en la que el direccionamiento (por ejemplo, modulación) de TLR3 sea útil. TLR3 se ha encontrado en algunos casos de inflamación en la superficie de macrófagos y el bloqueo de TLR3 tras la neutralización con cloroquina de acidificación endosómica, sin embargo, presentó algo de actividad antiinflamatoria (Cavassani et al. 2008, arriba). Sin embargo, los anticuerpos de la divulgación tendrán la mayor ventaja con respecto a otros anticuerpos en el tratamiento o prevención de enfermedades en las que la modulación (por ejemplo, inhibición) de la señalización por TLR3 en los compartimentos citosólicos (por ejemplo, endosómicos) es útil o requerida, y la importancia relativa de modular la señalización de tal TLR3 de los compartimentos puede depender de la enfermedad. Un ejemplo de una enfermedad tal es la artritis reumatoide; se cree que el TLR3 expresado en compartimentos endosómicos desempeña una función importante en artritis reumatoide, ya que el tratamiento con cloroquina, un inhibidor de la acidificación endosómica, inhibe la señalización de TLR3 e inhibe la producción de citocinas inflamatorias de cultivos sinoviales de pacientes que tienen artritis reumatoide (Sacre et al. (2008) J. Immunol. 181:8002-8009). Se cree que el TLR3 expresado en compartimentos endosómicos desempeña una función importante en varias otras enfermedades en las que CD (por ejemplo, CD mieloides) participan en el agravamiento de la enfermedad, ya que las CDm tienen una capacidad bien documentada de captar antígenos de células apoptóticas o necróticas que incluyen durante la necrosis de tejido durante la inflamación aguda.

Como los presentes anticuerpos son específico para TLR3, también pueden usarse para otros fines, que incluyen purificar TLR3 o células que expresan TLR3, modular (por ejemplo, activar o inhibir) receptores TLR3 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, dirigir células que expresan TLR3 para la destrucción *in vivo*, o marcar/unir específicamente TLR3 *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, que incluye métodos tales como inmunotransferencia, análisis de IHC, es decir, sobre biopsias congeladas, análisis de FACS e inmunoprecipitación.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "ligandos de TLR3" se refiere a cualquier compuesto que pueda unirse específicamente a y alterar la actividad de TLR3 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El compuesto puede ser un ligando que se produce naturalmente, por ejemplo, generalmente ARNbc o ARNbc viral, o un ligando sintético tal como poliIC o poliAU. El compuesto puede ser cualquier tipo de molécula, que incluye compuestos inorgánicos o orgánicos o elementos, que incluyen proteínas (tales como anticuerpos), ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, o cualquier otra entidad molecular. Además, tales compuestos pueden modular receptores TLR3 de cualquier modo, que incluye activando o inhibiendo, y por cualquier mecanismo, que incluye uniendo al receptor y desencadenando o cortando la actividad de un modo similar a un ligando que se produce naturalmente, o uniendo al receptor y bloqueando el acceso a otros ligandos. Preferentemente, el ligando activa el receptor, y como tal puede usarse para inducir la producción de citocinas por células que expresan TLR3.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable, de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, que es principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. IgG y/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleadas en la presente invención, siendo IgG particularmente preferida, debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que son los que más fácilmente se preparan en un ámbito de laboratorio. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. Particularmente se prefieren anticuerpos humanizados, quiméricos, humanos, o adecuados por lo demás humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

El término "se une específicamente a" significa que un anticuerpo puede unirse preferentemente en un ensayo de unión competitiva al componente de unión, por ejemplo, TLR3, como se evalúa usando tanto formas recombinantes de las proteínas, epítopes en ellas, como proteínas nativas presentes sobre la superficie de células diana aisladas. Ensayos de unión competitiva y otros métodos para determinar la unión específica se describen adicionalmente más adelante y son muy conocidos en la técnica.

Cuando se dice que un anticuerpo “compite con” un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3), significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión usando tanto moléculas de TLR3 recombinantes como moléculas de TLR3 expresadas en la superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 a un polipéptido TLR3 o célula que expresa TLR3 en un ensayo de unión, el anticuerpo se dice que “compite” respectivamente con 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3.

El término “afinidad”, como se usa en el presente documento, significa la intensidad de la unión de un anticuerpo a un epítotope. La afinidad de un anticuerpo se facilita por la constante de disociación K_d , definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, en la que $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo sin unir y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno sin unir. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$. Métodos preferidos para determinar la afinidad de mAb pueden encontrarse en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). Un método preferido y convencional muy conocido en la técnica para determinar la afinidad de mAb es el uso de instrumentos de Biacore.

Dentro del contexto de la presente invención, un “determinante” designa un sitio de interacción o unión sobre un polipéptido.

El término “epítotope” se define como un determinante antigénico, y es el área o región sobre un antígeno con el que se une un anticuerpo. Un epítotope de proteína puede comprender residuos de aminoácidos que participan directamente en la unión, además de residuos de aminoácidos que son eficazmente bloqueados por el anticuerpo o péptido de unión al antígeno específico, es decir, residuos de aminoácidos dentro de la “huella” del anticuerpo. Es la forma más simple o área estructural más pequeña sobre una molécula de antígeno compleja que puede combinarse con, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor. Los epítotospes pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. El término “epítotope lineal” se define como un epítotope compuesto de residuos de aminoácidos que son contiguos sobre la secuencia de aminoácidos lineal (estructura primaria). El término “epítotope conformacional o estructural” se define como un epítotope compuesto de residuos de aminoácidos que no son todos contiguos y así representan partes separadas de la secuencia de aminoácidos lineal que se ponen en proximidad entre sí por plegamiento de la molécula (estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítotope conformacional depende de la estructura tridimensional. El término 'conformacional' se usa, por tanto, frecuentemente indistintamente con 'estructural'.

Por “fragmento inmunogénico”, en el presente documento significa cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que puede provocar una respuesta inmunitaria tal como (i) la generación de anticuerpos que se unen a dicho fragmento y/o que se unen a cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, que incluye el receptor unido a la membrana y mutantes derivados del mismo, (ii) la estimulación de una respuesta de linfocitos T que implica linfocitos T que reaccionan con el complejo bi-molecular que comprende cualquier molécula del MHC y un péptido derivado de dicho fragmento, (iii) la unión de vehículos transfectados tales como bacteriófagos o genes que expresan bacterias que codifican inmunoglobulinas de mamífero. Alternativamente, un fragmento inmunogénico también se refiere a cualquier construcción que puede provocar una respuesta inmunitaria como se ha definido anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado con una proteína transportadora por acoplamiento covalente, una construcción quimérica de polipéptido recombinante que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, y específicamente incluye células transfectadas con un ADNc cuya secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

Péptidos “tóxicos” o “citotóxicos” o moléculas pequeñas engloban cualquier compuesto que puede ralentizar, detener o invertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier forma detectable, o destruirlas directa o indirectamente. Preferentemente, los compuestos tóxicos o citotóxicos funcionan destruyendo directamente las células, provocando la apoptosis o de otro modo. Como se usa en el presente documento, un “péptido” tóxico puede incluir cualquier péptido, polipéptido, o derivado de tales, que incluye derivados de péptidos o polipéptidos con aminoácidos no naturales o enlaces modificados. Una “molécula pequeña” tóxica puede incluir cualquier compuesto o elemento tóxico, preferentemente con un tamaño de inferior a 10 kD, 5 kD, 1 kD, 750 D, 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, o más pequeño.

Un anticuerpo “adecuado para ser humano” se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado o fragmento de anticuerpo que pueda usarse con seguridad en seres humanos para, por ejemplo, los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Anticuerpos adecuados para ser humano incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos, o completamente humanos, o cualquier anticuerpo en el que al menos una porción de los anticuerpos se deriva de seres humanos o se modifica de otro modo de manera que se evite la respuesta inmunitaria que es generalmente provocada cuando se usan anticuerpos no humanos nativos.

Para los fines de la presente invención, un anticuerpo “humanizado” o “humano” se refiere a un anticuerpo en el que la región estructural constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas está fusionada con la región de unión, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina de animal. Tales anticuerpos se diseñan para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del que se derivan las regiones de unión, pero para evitar una

reacción inmunitaria contra el anticuerpo no humano. Tales anticuerpos pueden obtenerse de ratones transgénicos u otros animales que se han “manipulado” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a exposición antigénica (véanse, por ejemplo, Green et al. (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856; Taylor et al. (1994) *Int Immun* 6:579). También puede construirse un anticuerpo completamente humano por métodos de transfección genética o cromosómica, además de tecnología de expresión en fago, todos los cuales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-553). Los anticuerpos humanos también pueden generarse por linfocitos B activados *in vitro* (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) esté ligado a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia con una región variable que tiene una especificidad por antígeno diferente o alterada.

Los términos “dominio Fc”, “porción Fc” y “región Fc” se refieren a un fragmento del extremo C de una cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido (aa) 230 a aproximadamente el aa 450 de la cadena pesada γ (gamma) humana o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas del anticuerpo (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo que se produce naturalmente del mismo. A menos que se especifique de otro modo, la numeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas se usa en toda la presente divulgación (véase Kabat et al. (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. La pureza y homogeneidad normalmente se determinan usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce naturalmente correspondiente, además de polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente y polímero de aminoácidos que no se producen naturalmente.

El término “recombinante”, cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan de otro modo anormalmente, se expresan por disminución o no se expresan en absoluto.

Dentro del contexto de la presente invención, el término anticuerpo que “se une” a un determinante común designa un anticuerpo que se une a dicho determinante con especificidad y/o afinidad.

Producción de anticuerpos anti-TLR3

Los anticuerpos de la presente divulgación se unen específicamente a TLR3. Los anticuerpos de la divulgación se unen además a TLR3 en condiciones ácidas correspondientes a aquellas encontradas en un compartimento endosómico acidificado. Los anticuerpos de la divulgación son además capaces de inhibir la vía de señalización de TLR3. La capacidad de los anticuerpos inhibidores para inhibir específicamente la vía de señalización de TLR3 los hace útiles para numerosas aplicaciones, en particular para tratar o prevenir enfermedades en las que la inhibición de la vía de señalización de TLR3 se desea, es decir, evitar la secreción adicional de citocinas y quimiocinas, además de la activación celular, como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, y compite para unirse a TLR3 humano con el anticuerpo monoclonal 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. El anticuerpo 31C3 se produce por la célula depositada como 31C3.1 en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue de Docteur Roux, F-75724, París el 3 de julio de 2009, bajo el número CNCM I-4186. El anticuerpo 29H3 se produce por la célula depositada como 29H3.7 en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue de Docteur Roux, F-75724, París el 3 de julio de 2009, bajo el número CNCM I-4187.

“TLR3”, “polipéptido TLR3” y “receptor TLR3”, usados indistintamente, se usan en el presente documento para referirse al receptor 3 de tipo toll, un miembro de la familia de receptores de tipo toll (TLR). La secuencia de aminoácidos de TLR3 humano se muestra en SEC ID Nº: 1 (número de acceso de NCBI NP_003256). La secuencia

del ARNm de TLR3 humano se describe en el número de acceso de NCBI NM_003265. Secuencias de TLR3 humano también se describen en la publicación de patente PCT nº WO 98/50547.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con el anticuerpo monoclonal 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 y reconoce, se une a, o tiene inmunoespecificidad por sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo, epítoto o "sitio epitópico" sobre una molécula de TLR3 como el anticuerpo monoclonal 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. En otros aspectos, el anticuerpo monoclonal consiste en, o es un derivado o fragmento del, anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3.

10 Se apreciará que, mientras que los anticuerpos preferidos se unen al mismo epítoto que el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, los presentes anticuerpos pueden reconocer y producirse contra cualquier parte del polipéptido TLR3. Por ejemplo, cualquier fragmento de TLR3, preferentemente pero no exclusivamente TLR3 humano, o cualquier combinación de fragmentos de TLR3, puede usarse como inmunógenos para producir anticuerpos, y los anticuerpos de la divulgación pueden reconocer epítotos en cualquier localización dentro del polipéptido TLR3, mientras que pueden hacer eso en células que expresan TLR3 tales como CDMd o CDMo como se describe en el presente documento. En un aspecto, los epítotos reconocidos están presentes sobre la superficie celular, es decir, están accesibles a anticuerpos presentes fuera de la célula. Lo más preferentemente, el epítoto es el epítoto específicamente reconocido por el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Además, los anticuerpos que reconocen distintos epítotos dentro de TLR3 pueden usarse en combinación, por ejemplo, para unirse a polipéptidos TLR3 con máxima eficacia y amplitud entre diferentes individuos.

25 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, se producen por inmunización de un animal no humano, preferentemente un ratón, con un inmunogén que comprende un polipéptido TLR3, preferentemente un polipéptido TLR3 humano. El polipéptido TLR3 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido TLR3 humano, o un fragmento o derivado del mismo, normalmente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítoto expuesto sobre la superficie de células que expresan un polipéptido TLR3, preferentemente el epítoto reconocido por el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Tales fragmentos normalmente contienen al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptidos madura, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de la misma. Los fragmentos normalmente se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. En un aspecto preferido, el inmunogén comprende un polipéptido TLR3 humano no mutante en una membrana de lípido, normalmente en la superficie de una célula. En un aspecto específico, el inmunogén comprende células intactas, particularmente células humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido TLR3 recombinante.

40 La etapa de inmunizar un mamífero no humano con un antígeno puede llevarse a cabo de cualquier manera muy conocida en la técnica para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El inmunogén se suspende o disuelve en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund. Métodos para determinar la cantidad de inmunogén, tipos de tampones y cantidades de adyuvante son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y no están limitando de ningún modo la presente divulgación. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero se esclarecen fácilmente.

45 Similarmente, la localización y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también es muy conocida en la técnica. En un protocolo de inmunización típico, los animales no humanos se inyectan intraperitonealmente con antígeno en el día 1 y de nuevo aproximadamente una semana después. Esto va seguido de inyecciones de recuerdo del antígeno aproximadamente en el día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de recuerdo se realizan intravenosamente y pueden repetirse durante varios días consecutivos. Esto va seguido de una inyección de refuerzo en el día 40, tanto intravenosa como intraperitonealmente, normalmente sin adyuvante. Este protocolo produce la producción de linfocitos B productores de anticuerpos específicos de antígeno después de aproximadamente 40 días. También pueden usarse otros protocolos en tanto que produzcan la producción de linfocitos B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en inmunización.

55 Para la preparación de anticuerpos policlonales, se obtiene suero de un animal inmunizado no humano y los anticuerpos presentes en él se aíslan por técnicas muy conocidas. El suero puede purificarse por afinidad usando cualquiera de los inmunógenos expuestos anteriormente ligados a soporte sólido de manera que se obtengan anticuerpos que reaccionan con polipéptidos TLR3.

60 En un aspecto alternativo, linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado se aíslan, se cultivan *in vitro* y luego se exponen al inmunogén en cultivo celular. Entonces se recogen los linfocitos y se lleva a cabo la etapa de fusión descrita más adelante.

65 Para anticuerpos monoclonales preferidos, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la posterior fusión de aquellos esplenocitos con una célula inmortalizada con el fin de formar

un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es muy conocido en la técnica y normalmente implica extraer el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en pequeños trozos y estrujar los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nailon de un filtro de células en un tampón apropiado de manera que se produzca una suspensión de células individuales. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La disolución se centrifuga de nuevo y los linfocitos restantes en el sedimento se resuspenden finalmente en tampón fresco.

Una vez aislados y presentes en suspensión de células individuales, los linfocitos pueden fusionarse con una línea de células inmortales. Ésta es normalmente una línea de células de mieloma de ratón, aunque en la técnica se conocen muchas otras líneas de celulares inmortales útiles para crear hibridomas. Líneas de mieloma murino preferidas incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, EE.UU., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland EE.UU. La fusión se efectúa usando polietilenglicol o similares. Entonces, los hibridomas resultantes se cultivan en medios selectivos que contienen una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Los hibridomas normalmente se cultivan sobre una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son preferentemente de compañeros de camada del mamífero no humano usado para aislar los esplenocitos y normalmente se ceban con adyuvante incompleto de Freund o similares varios días antes de sembrar los hibridomas. Se describen métodos de fusión en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células se dejan cultivar en medios de selección durante tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Esto es normalmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Entonces se ensayan las colonias de hibridomas para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a productos génicos de polipéptidos TLR3, opcionalmente el epítipo específicamente reconocido por el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. El ensayo normalmente es un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque puede emplearse cualquier ensayo que pueda adaptarse a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o citometría de flujo activada por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpos deseados se examinan para determinar si están presentes una o más colonias distintas. Si está presente más de una colonia, las células pueden volver a clonarse y cultivarse para garantizar que solo una célula individual ha dado lugar a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Normalmente, los anticuerpos también se probarán para la capacidad para unirse a polipéptidos TLR3, por ejemplo, células que expresan TLR3, en secciones de tejido incorporadas en parafina, como se describe más adelante.

Los hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación pueden cultivarse hasta en mayores cantidades en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Después de que el crecimiento suficiente produzca el anticuerpo monoclonal, el medio de crecimiento que contiene anticuerpo monoclonal (o el líquido ascítico) se separa de las células y el anticuerpo monoclonal presente en él se purifica. La purificación se logra normalmente por electroforesis en gel, diálisis, cromatografía usando proteína A o proteína G-Sepharose, o una Ig anti-ratón ligada a un soporte sólido tal como agarosa o perlas Sepharose (todas descritas, por ejemplo, en Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación nº 18-1037-46, Edition AC). El anticuerpo unido normalmente se eluye de columnas de proteína A/proteína G usando tampones a pH bajo (tampones glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de las fracciones que contienen el anticuerpo. Estas fracciones se reúnen, se dializan y se concentran según se necesite.

Los pocillos positivos con una única colonia evidente normalmente se vuelven a clonar y se vuelven a ensayar para asegurar que solo un anticuerpo monoclonal esté siendo detectado y producido.

Los anticuerpos también pueden producirse por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se desvela, por ejemplo, en (Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544).

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a TLR3, particularmente sustancialmente o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, puede determinarse fácilmente usando uno cualquiera de una variedad de ensayos de cribado inmunológicos en los que puede evaluarse la competición del anticuerpo. Muchos de tales ensayos se ponen rutinariamente en práctica y son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.660.827, concedida el 26 de agosto de 1997). Se entenderá que en realidad no se requiere de ningún modo determinar el epítipo al que un anticuerpo descrito en el presente documento se une para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento.

Por ejemplo, si los anticuerpos de prueba que van a examinarse se obtienen de diferentes animales fuente, o son incluso de un isotipo de Ig diferente, puede emplearse un simple ensayo de competición en el que se mezclan el control (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) y anticuerpos de prueba (o pre-adsorbidos) y se aplican a una muestra que contiene polipéptidos TLR3. Protocolos basados en transferencia Western y el uso de análisis BIACORE son adecuados para su uso en tales estudios de competición.

En ciertos aspectos, se premezclan los anticuerpos de control (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) con cantidades variables de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo antes de aplicar a la muestra de antígeno de TLR3. En otros aspectos, las cantidades de control y variables de los anticuerpos de prueba pueden simplemente mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno de TLR3. En tanto que puedan distinguirse anticuerpos unidos de libres (por ejemplo, usando técnicas de separación o de lavado para eliminar anticuerpos sin unir) y 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, usando anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o marcando específicamente 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 con una marca detectable), puede determinarse si los anticuerpos de prueba reducen la unión de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 a los antígenos, que indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítotope que 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir de alto valor de control. El valor de bajo control puede obtenerse incubando los anticuerpos marcados (31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) con anticuerpos sin marcar de exactamente el mismo tipo (31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3), si la competición se produjera y redujera la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativa de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítotope, es decir, uno que "reacciona de forma cruzada" o compite con el anticuerpo marcado (31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3). Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 a antígenos de TLR3 al menos aproximadamente el 50 %, tal como al menos aproximadamente el 60 %, o más preferentemente al menos aproximadamente el 80 % o el 90 % (por ejemplo, aproximadamente 65-100 %), a cualquier relación de anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3:de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítotope o determinante que 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Preferentemente, tal anticuerpo de prueba reducirá la unión de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 al antígeno de TLR3 al menos aproximadamente el 90 % (por ejemplo, aproximadamente el 95 %).

La competición también puede evaluarse, por ejemplo, por una prueba de citometría de flujo. En una prueba tal, las células que llevan un polipéptido TLR3 dado pueden incubarse primero con 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, por ejemplo, y a continuación con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 si la unión obtenida tras la preincubación con una cantidad saturante de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 es aproximadamente el 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %, 20 % o el 10 %) de la unión (como se mide por la media de la fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin preincubación con 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 si la unión obtenida con un anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 marcado (por un fluorocromo o biotina) sobre células preincubadas con una cantidad de saturación de anticuerpo de prueba es aproximadamente el 80 %, preferentemente aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 %, o menos (por ejemplo, aproximadamente el 30 %, 20 % o 10 %) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

También puede emplearse un simple ensayo de competición en el que un anticuerpo de prueba se pre-adsorbe y se aplica a la concentración de saturación a una superficie sobre la que un antígeno de TLR3 se inmoviliza. La superficie en el simple ensayo de competición es preferentemente un chip de BIACORE (u otro medio adecuado para análisis de resonancia de plasmones superficiales). El anticuerpo de control (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) se pone entonces en contacto con la superficie a una concentración de saturación de TLR3 y se mide la unión de TLR3 y de la superficie del anticuerpo control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene TLR3 en ausencia del anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene TLR3 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítotope que el anticuerpo de control de forma que el anticuerpo de prueba "reacciona de forma cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión del anticuerpo de control (tal como 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) a un antígeno de TLR3 al menos aproximadamente el 30 % o más, preferentemente aproximadamente el 40 %, puede considerarse que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítotope o determinante que un control (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3). Preferentemente, un anticuerpo de prueba tal reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3) al antígeno de TLR3 al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, o más). Se apreciará que puede invertirse el orden de los anticuerpos de control y de prueba: es decir, el anticuerpo de control puede unirse primero a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie a partir de aquí en un ensayo de competición. Preferentemente, el anticuerpo que tiene mayor afinidad por el antígeno de TLR3 se une primero a la superficie, ya que cabría esperar que la disminución en

la unión observada para el segundo anticuerpo (suponiendo que los anticuerpos están reaccionando de forma cruzada) sea de mayor magnitud. Otros ejemplos de tales ensayos se proporcionan en, por ejemplo, Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una región de epítipo puede llevarse a cabo de formas conocidas para el experto en la materia. Como un ejemplo de tales métodos de mapeo/caracterización, una región de epítipo para un anticuerpo anti-TLR3 puede determinarse por "huella" de epítipo usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína TLR3. Un ejemplo específico de una técnica de huella tal es el uso de HXEM (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de la proteína de receptor y ligando, y retro-intercambio, en el que los grupos de esqueleto amida que participan en la unión de proteína se protegen del retro-intercambio y, por tanto, seguirán deuterados. Pueden identificarse regiones relevantes en este momento por proteólisis péptica, separación por cromatografía de líquidos de alto rendimiento rápida en Microbore y/o espectrometría de masas de ionización por electropulverización. Véase, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítipes adecuada es el mapeo de epítipes por resonancia magnética nuclear (RMN), en la que normalmente se comparan la posición de las señales en espectros de RMN dimensional del antígeno libre y el antígeno complejado con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente se marca selectivamente isotópicamente con ^{15}N de manera que solo señales correspondientes al antígeno y no señales del péptido de unión al antígeno se observan en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan de aminoácidos que participan en la interacción con el péptido de unión al antígeno normalmente desplazarán la posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos que participan en la unión pueden identificarse de esa forma. Véanse, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. 1996 Jun; 9 (3): 516-24.

También puede realizarse mapeo/caracterización de epítipes usando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downward, *J Mass Spectrom.* 2000 Apr; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1999 May 1; 71 (9): 1792-801. También pueden ser útiles técnicas de digestión con proteasa en el contexto del mapeo e identificación de epítipes. Pueden determinarse regiones/secuencias relevantes de determinante antigénico por digestión con proteasa, por ejemplo, usando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 para TLR3 o digestión durante la noche a pH 7-8, seguido de análisis de espectrometría de masas (EM) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina por el agente de unión anti-TLR3 pueden posteriormente identificarse por comparación de muestras sometidas a digestión por tripsina e incubarse las muestras con anticuerpo y luego someterse a digestión por, por ejemplo, tripsina (revelando así una huella para el agente de unión). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., también pueden usarse o pueden usarse alternativamente en métodos de caracterización de epítipes similares. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una posible secuencia de determinante antigénico está dentro de una región del polipéptido TLR3 que no está expuesto en la superficie y, por consiguiente, lo más probablemente no relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991; 27: 15-9 para una discusión de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para la elucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en "barrido por alanina", cada residuo dentro de un segmento de proteína se sustituye con un residuo de alanina, y se miden las consecuencias para la afinidad de unión. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de unión, lo más probable es que participe en la unión. Pueden usarse anticuerpos monoclonales específicos para epítipes estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína sin plegar) para verificar que la sustitución por alanina no influye en el plegamiento global de la proteína. Véase, por ejemplo, Clackson y Wells, *Science* 1995; 267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6.

También puede usarse microscopía electrónica para la "huella" de epítipo. Por ejemplo, Wang et al., *Nature* 1992; 355:275-278 usaron la aplicación coordinada de microscopía crioelectrónica, reconstrucción de imágenes tridimensionales y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab sobre la superficie de la cápside del virus del mosaico del frijol nativo.

Otras formas de ensayo "libre de marca" para la evaluación de epítipes incluyen resonancia de plasmones superficiales (SPR, BIACORE) y espectroscopía de interferencia reflectométrica (RiFS). Véase, por ejemplo, Fägerstam et al., *Journal of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice et al., *J. Chromatogr.* 1993; 646:159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kröger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

Debe también observarse que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo de la divulgación puede identificarse en uno o más de los ensayos de competición a modo de ejemplo descritos en el presente documento.

Una vez se identifican anticuerpos que pueden unirse a TLR3 y/o que tienen otras propiedades deseadas, también se evaluarán normalmente, usando métodos convencionales que incluyen aquellos descritos en el presente documento, para su capacidad para unirse a otros polipéptidos, que incluyen polipéptidos sin relacionar y otros

- miembros de la familia de TLR (por ejemplo, TLR1, 2, o 4-10 humanos). Idealmente, los anticuerpos solo se unen con afinidad sustancial a TLR3, por ejemplo, TLR3 humano, y no se unen a un nivel significativo a polipéptidos sin relacionar o a otros miembros de la familia de TLR (por ejemplo, TLR2 o TLR4; la secuencia de aminoácidos del precursor humano TLR4 que incluye un péptido señal en los residuos de aminoácidos 1-23 se encuentra en el número de acceso de NCBI NP_612564). Sin embargo, se apreciará que, en tanto que la afinidad por TLR3 es sustancialmente mayor (por ejemplo, 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10.000x, o más) que por otros miembros de la familia de TLR (u otros polipéptidos sin relacionar), entonces los anticuerpos son adecuados para su uso en los presentes métodos.
- La unión de los anticuerpos a células que expresan TLR3 también puede evaluarse en primates no humanos, por ejemplo, monos cinomolgos, u otros mamíferos tales como ratones. Por tanto, la divulgación proporciona un anticuerpo, además de fragmentos y derivados de los mismos, en el que dicho anticuerpo, fragmento o derivado se une específicamente a TLR3, y que además se une a TLR3 de primates no humanos, por ejemplo, monos cinomolgos. Opcionalmente, la captación o localización celular, opcionalmente la localización en un compartimento subcelular tal como la vía endocítica, se evalúa con el fin de seleccionar un anticuerpo que sea fácilmente captado en la célula y/o en el compartimento celular en el que se expresa TLR3. La captación o localización celular generalmente se medirá en las células en las que se busca el anticuerpo o se cree que ejerce su actividad, tal como en CD. La captación o localización celular puede evaluarse por métodos convencionales, tales como por tinción confocal usando un anticuerpo marcado con un resto detectable (por ejemplo, un resto fluorescente).
- Tras la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, pueden realizarse etapas de selección particulares para aislar anticuerpos según se reivindica. A este respecto, en un aspecto específico, la divulgación también se refiere a métodos de producción de tales anticuerpos, que comprenden: (a) inmunizar un mamífero no humano con un inmunogén que comprende un polipéptido TLR3; y (b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado; y (c) seleccionar anticuerpos de la etapa (b) que pueden unirse a TLR3. Los anticuerpos pueden probarse para unirse a TLR3 en condiciones ácidas correspondientes a aquellas en compartimentos citosólicos (por ejemplo, los compartimentos endosómicos), tal como a un pH de entre aproximadamente 5,5 y 6,5.
- Puede determinarse la afinidad de unión bivalente por anticuerpos para TLR3 humano en condiciones ácidas. Los anticuerpos pueden caracterizarse, por ejemplo, por una K_D media de no superior a aproximadamente (es decir, mejor afinidad que) 100, 60, 10, 5 o 1 nanomolar, preferentemente sub-nanomolar u opcionalmente no superior a aproximadamente 300, 200, 100 o 10 picomolar. K_D puede determinarse por ejemplo, por ejemplo, inmovilizando las proteínas TLR3 humanas recombinantemente producidas sobre una superficie de chip, seguido de la aplicación del anticuerpo que va a probarse en disolución, por ejemplo, como se muestra en los presentes ejemplos. Para seleccionar anticuerpos que retienen unión similar a la unión bajo condiciones ácidas y neutras, puede buscarse minimizar la diferencia observada entre la unión a pH neutro (por ejemplo, 7,2) y pH ácido (por ejemplo, a pH en el intervalo de 4,5-6-5), por ejemplo, si la afinidad de unión a pH ácido no es sustancialmente menor, por ejemplo, si la K_D para unirse a TLR3 disminuye no más de 0,2-, 0,3-, 0,5-, 1,0- o 1,5- \log_{10} , que aquella observada a pH no ácido. En un aspecto, el método comprende además una etapa (d), seleccionar anticuerpos de (b) que pueden competir para unirse a TLR3 con el anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3.
- En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos preparados según los presentes métodos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano usado para producir los anticuerpos según los métodos de la divulgación es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, ave de corral, caballo, conejo, cabra u oveja. Los anticuerpos de la presente divulgación engloban 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Sin embargo, se apreciará que pueden obtenerse otros anticuerpos usando los métodos descritos en el presente documento, y así los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos distintos de 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3. Adicionalmente, los anticuerpos de la divulgación pueden opcionalmente especificarse por ser anticuerpos distintos de cualquiera de los anticuerpos TLR3.7 (eBioScience Inc., San Diego), anticuerpo C1068 del documento WO 06/060513, anticuerpo C1130 del documento WO 2007/051164, cualquiera de los anticuerpos desvelados en el documento WO2010/051470, por ejemplo, los anticuerpos 1-19 y F17-F19, anticuerpo 40C1285 (Abcam), o anticuerpos 619F7, 713E4, 716G10, IMG-5631, IMG-315 o IMG-5348 (todos de Imgenex. Corp.) o derivados de los anteriores, por ejemplo, que comprenden la región de unión al antígeno por completo o en parte.
- Según un aspecto alternativo, el ADN que codifica un anticuerpo que se une al epítipo presente sobre polipéptidos TLR3 se aísla del hibridoma de la presente divulgación y se coloca en un vector de expresión apropiado para la transfección en un huésped apropiado. Entonces se usa el huésped para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento del antígeno del anticuerpo, o versiones que comprenden un resto detectable.
- El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la divulgación, por ejemplo, anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster

chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Como se describe en cualquier parte en la presente memoria descriptiva, tales secuencias de ADN pueden modificarse para cualquiera de un gran número de fines, por ejemplo, para humanizar anticuerpos, producir fragmentos o derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de unión al antígeno con el fin de optimizar la especificidad de unión del anticuerpo.

La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo es muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992).

Evaluación de la capacidad de anticuerpos para modular la señalización de TLR3

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación pueden modular, por ejemplo, inhibir la señalización por, polipéptidos TLR3, y, por consiguiente, modular la actividad o comportamiento de células que expresan TLR3. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la activación de células que expresan TLR3, por ejemplo, pueden inhibir la vía de señalización de TLR3, opcionalmente sin bloquear la unión a TLR3 de ligandos naturales o endógenos tales como ARNbc; opcionalmente pueden bloquear la capacidad de proteína TLR3 para formar homodímeros en presencia de un ligando de TLR3, bloqueando así la iniciación de una cascada de señalización. Así, estos anticuerpos se denominan anticuerpos "neutralizantes" o "inhibidores" o "bloqueantes". Tales anticuerpos son útiles, entre otras cosas, para disminuir la actividad de células inmunitarias que expresan TLR3, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de condiciones que implican el exceso de actividad o número de células que expresan TLR3, o si la disminución de la actividad de células que expresan TLR3 puede recuperar, prevenir, eliminar o mejorar de alguna forma la afección o cualquier síntoma de la misma.

Puede usarse una variedad de ensayos celulares para evaluar la capacidad de los anticuerpos para modular la señalización de TLR3. Puede usarse cualquiera de un gran número de ensayos, que incluyen modelos moleculares, basados en células y basados en animales para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-TLR3 para modular la actividad de células que expresan TLR3. Por ejemplo, pueden usarse ensayos basados en células en los que las células que expresan TLR3 se exponen a ARNbc, ARNbc viral, poliIC o poli AU, u otro ligando de TLR3 y se evalúa la capacidad del anticuerpo para romper la unión del ligando o la estimulación del receptor (como se ha determinado, por ejemplo, examinando cualquiera de las actividades de células de TLR3 tratadas en el presente documento, tal como expresión de interferón, actividad de NF- κ B, activación celular de NK, etc.). El ligando de TLR3 usado en los ensayos puede estar en cualquier forma, que incluye, pero no se limita a, como una composición de ligando purificada, en una mezcla con ligandos no de TLR3, en una composición que se produce naturalmente, en una célula o sobre la superficie de una célula, o secretada por una célula (por ejemplo, se usa en el ensayo una célula que produce ligando), en disolución o sobre un soporte sólido.

La actividad de células que expresan TLR3 también puede evaluarse en ausencia de un ligando, exponiendo las células al propio anticuerpo y evaluando su efecto sobre cualquier aspecto de la actividad o comportamiento de las células. En tales ensayos se obtiene un nivel de actividad de referencia (por ejemplo, producción de citocinas, proliferación, véase más adelante) de las células que expresan TLR3 en ausencia de un ligando, y se detecta la capacidad del anticuerpo o compuesto para alterar el nivel de actividad de referencia. En un aspecto tal, se usa un enfoque de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos que pueden afectar la activación del receptor.

Puede usarse cualquier cambio fisiológico adecuado que refleje la actividad de TLR3 para evaluar los anticuerpos de prueba o derivados de anticuerpo. Por ejemplo, puede medirse una variedad de efectos, tales como cambios en la expresión génica (por ejemplo, genes que responden a NF- κ B), secreción de proteína (por ejemplo, interferón), crecimiento celular, proliferación celular, pH, segundos mensajeros intracelulares, por ejemplo, Ca²⁺, IP3, GMPc o AMPc, o actividad tal como la capacidad para activar células NK. En un aspecto, la actividad del receptor se evalúa detectando la producción de citocinas, por ejemplo, citocinas sensibles a TLR3, citocinas proinflamatorias.

La modulación de TLR3 puede evaluarse usando cualquiera de varios posibles sistemas de lectura, principalmente basados en una vía de transducción de señales de TLR/IL-1R, que implica, por ejemplo, la vía de transducción de señales independiente de MyD88/dependiente de TRIF, que implica, por ejemplo, IRF3, IRF7, IKK ϵ y/o TBK1 (Akira y Takeda (2004) *Nature Review Immunol.* 4:499-511). Estas vías activan cinasas que incluyen el complejo de KB-cinasa. La activación de TLR3 puede evaluarse examinando cualquier aspecto de la señalización de TLR. Por ejemplo, la activación de la señalización de TLR desencadena alteraciones en asociaciones proteína-proteína (por ejemplo, TRIF con TBK y/o IKK ϵ), en la localización intracelular de proteínas (tal como el movimiento de NK- κ B en el núcleo) y en la expresión génica (por ejemplo, en la expresión de genes sensibles a NK- κ B) y producción de citocinas (por ejemplo, producción y secreción de IFN-gamma, IL-6, IP10, MCP-1). Cualquiera de tal alteración puede detectarse y usarse para detectar la activación de TLR3. En un aspecto, la estimulación de TLR3 se detecta recogiendo sobrenadantes después de 18-20 h de cultivo y midiendo los niveles de IFN-gamma, IL-6, IP-10 y/o MCP-1 por ELISA de sándwich. En otro aspecto, la estimulación de TLR3 se detecta recogiendo sobrenadantes después de 18-20 h de cultivo y midiendo niveles de IFN-gamma, IL-6, IP-10 y/o MCP-1 por ELISA de sándwich.

En un aspecto se usan células que naturalmente expresan TLR3, tales como CD (por ejemplo, CD mieloides o CD derivadas de monocitos). En otro aspecto, se usan células que contienen una construcción indicadora que produce la expresión de un producto génico detectable tras la estimulación de TLR3 y posterior activación de la vía de transducción de señales. Genes indicadores y construcciones de genes indicadores particularmente útiles para los ensayos incluyen, por ejemplo, un gen indicador operativamente ligado a un promotor sensible a NF- κ B o a señalización mediada por, particularmente TRIF, IRF3, IRF7, IKK ϵ , TBK1. Ejemplos de tales promotores incluyen, sin limitación, aquellos para IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 p40, IP-10, CD80, CD86 y TNF- α . El gen indicador operativamente ligado al promotor sensible a TLR puede incluir, sin limitación, una enzima (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), etc.), un marcador de bioluminiscencia (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.491.084), proteína azul fluorescente (BFP, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.486.382), etc.), una molécula expresada en la superficie (por ejemplo, CD25, CD80, CD86) y una molécula secretada (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 p40, TNF- α). Véanse, por ejemplo, Hcker H et al. (1999) EMBO J. 18:6973-82; Murphy TL et al. (1995) Mol Cell Biol 15:5258-67. Están comercialmente disponibles plásmidos indicadores adecuados para su uso (InvivoGen, San Diego, CA). En un aspecto, el ensayo incluye determinar, en una célula huésped hecha para expresar un polipéptido TLR3 humano, si una composición de prueba induce la expresión de luciferasa (u otro indicador) bajo el control de un promotor sensible a la señalización de TLR3 (por ejemplo, ISRE, elemento de respuesta estimulada por IFN).

En ensayos que se basan en la lectura de actividad enzimática, el sustrato puede suministrarse como parte del ensayo, y la detección puede implicar la medición de quimioluminiscencia, fluorescencia, desarrollo de color, incorporación de marca radiactiva, resistencia a fármaco, densidad óptica, u otro marcador de actividad enzimática. Para ensayos que se basan en la expresión superficial de una molécula, la detección puede llevarse a cabo usando análisis de citometría de flujo (FACS) o ensayos funcionales. Pueden ensayarse moléculas secretadas usando enzimoanálisis de adsorción (ELISA) o bioensayos. Muchos de estos y otros sistemas de lectura adecuados son muy conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles. Preferentemente, el sistema indicador, sea cual sea el que se use, es cuantificable.

En otro aspecto, el efecto de los anticuerpos sobre células que expresan TLR3 se evalúa en primates no humanos *in vivo*. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TLR3 de la presente divulgación se administra a un primate no humano que está tanto sano como afectado por una afección, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o inflamación y se evalúa el efecto de la administración sobre, por ejemplo, el número o actividad de células que expresan TLR3 en el primate, la presencia y/o niveles de citocinas, o sobre la progresión de la afección. Cualquier anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento que afecte un cambio detectable en cualquiera de estos parámetros relacionados con TLR3 es un candidato para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

En cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento, un aumento o disminución del 5 %, 10 %, 20 %, preferentemente 30 %, 40 %, 50 %, lo más preferentemente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o mayor, en cualquier medida detectable de la actividad estimulada por TLR3 en las células indica que el anticuerpo de prueba es adecuado para su uso en los presentes métodos.

Cuando se evalúan anticuerpos anti-TLR3 inhibidores, los anticuerpos pueden seleccionarse ventajosamente para modificar cualquier parámetro asociado a inflamación o autoinmunidad. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos para reducir la activación, particularmente producción de citocinas pro-inflamatorias, en células. Las células pueden ser, por ejemplo, células obtenidas de un individuo que padece un trastorno inflamatorio o autoinmunitario.

Secuencias de CDR de anticuerpos

En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo puede comprender una cadena pesada y/o ligera que tiene secuencias de CDR1, 2 y/o 3 según la fórmula respectiva seleccionada de las fórmulas (I) a (XX). En cualquier aspecto en el presente documento, puede especificarse que una HCDR1-3 o LCDR-1-3 particular tiene una secuencia de fórmulas (I) a (XX). En un aspecto preferido, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende las tres LCDR y una cadena pesada que comprende las tres HCDR. Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4.

En un aspecto, LCDR1 es de fórmula (I):

R-A-S-E-N-I-Y-S-Xaa₁-L-A (I) (SEC ID N°: 61)

en la que Xaa₁ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₁ puede ser Ser, Tyr o Asn.

En un aspecto, LCDR2 es de fórmula (II):

Xaa₂-A-K-T-L-A-E (II) (SEC ID N°: 62)

en la que Xaa₂ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₂ puede ser Asn o Tyr.

5 En un aspecto, LCDR3 es de fórmula (III):

Q-H-H-Y-G-T-P-Xaa₃-T (III) (SEC ID N°: 63)

en la que Xaa₃ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₃ puede ser Tyr, Phe, Pro.

10

En un aspecto, LCDR1 es de fórmula (IV):

Xaa₄-A-S-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂ (IV) (SEC ID N°: 64)

15

en la que Xaa₄ a Xaa₁₂ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₄ puede ser Arg, Ser o Lys, y/o Xaa₅ puede ser Glu, Ser o Gln, y/o Xaa₆ puede ser Asn o Ser, y/o Xaa₇ puede ser Ile o Val, y/o Xaa₈ puede ser una delección, Tyr o Arg, y/o Xaa₉ puede ser Ser o Thr, y/o Xaa₁₀ puede ser Tyr, Asn o Ser, y/o Xaa₁₁ puede ser Leu, Met o Val, y/o Xaa₁₂ puede ser Ala o Phe.

20

En un aspecto, LCDR1 es de fórmula (V):

Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-L-A-Xaa₁₇ (V) (SEC ID N°: 65)

25

en la que Xaa₁₃ a Xaa₁₇ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₁₃ puede ser Leu, Asn o Tyr, y/o Xaa₁₄ puede ser Ala o Thr, y/o Xaa₁₅ puede ser Lys o Ser, y/o Xaa₁₆ puede ser Asn o Thr, y/o Xaa₁₇ puede ser Glu o Ser.

En un aspecto, LCDR2 es de fórmula (VI):

30

Xaa₁₈-A-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Xaa₂₃ (VI) (SEC ID N°: 66)

en la que Xaa₁₉ a Xaa₂₃ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₁₈ puede ser Tyr, Asn o Leu, y/o Xaa₁₉ puede ser Ser o Lys, y/o Xaa₂₀ puede ser Asn o Thr, y/o Xaa₂₁ puede ser Leu o Arg, y/o Xaa₂₂ puede ser Ala o His, y/o Xaa₂₃ puede ser Thr o Glu.

35

En un aspecto, LCDR2 es de fórmula (VII):

L-Xaa₂₄-S-N-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇ (VII) (SEC ID N°: 67)

40

en la que Xaa₂₄ a Xaa₂₇ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₂₄ puede ser Thr o Ala, y/o Xaa₂₅ puede ser Leu o Arg, y/o Xaa₂₆ puede ser Ala o His, y/o Xaa₂₇ puede ser Ser o Thr.

En un aspecto, LCDR3 es de fórmula (VIII):

45

Q-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Xaa₃₀-G-Xaa₃₁-P-Xaa₃₂-T (VIII) (SEC ID N°: 68)

en la que Xaa₂₈ a Xaa₃₂ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₂₈ puede ser His o Gln, y/o Xaa₂₉ puede ser His o Trp, y/o Xaa₃₀ puede ser Tyr o Thr, y/o Xaa₃₁ puede ser Thr o Asn, y/o Xaa₃₂ puede ser Tyr, Phe o Pro.

50

En un aspecto, LCDR3 es de fórmula (IX):

Xaa₃₃-Xaa₃₄-H-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-P-Xaa₃₈-T (IX) (SEC ID N°: 69)

55

en la que Xaa₃₃ a Xaa₃₈ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₃₃ puede ser Gln o Leu, y/o Xaa₃₄ puede ser His o Gln, y/o Xaa₃₅ puede ser Trp o Tyr, y/o Xaa₃₆ puede ser Asn o Gly, y/o Xaa₃₇ puede ser Tyr o Thr, y/o Xaa₃₈ puede ser Tyr, Phe o Pro.

60

En un aspecto, LCDR3 es de fórmula (X):

Xaa₃₉-Q-Xaa₄₀-Xaa₄₁-Xaa₄₂-Xaa₄₃-P-Xaa₄₄-T (X) (SEC ID N°: 70)

en la que Xaa₄₀ a Xaa₄₄ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₃₉ puede ser Gln o Leu, y/o Xaa₄₀ puede ser Trp o His, y/o Xaa₄₁ puede ser Thr o Trp, y/o Xaa₄₂ puede ser Gly o Asn, y/o Xaa₄₃ puede ser Asn o Tyr, y/o Xaa₄₄ puede ser Pro o Tyr.

65

En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XI):

5 G-Y-S-F-T-G-Y-Xaa₄₅-Xaa₄₆-H (XI) (SEC ID N°: 71)
 en la que Xaa₄₅ a Xaa₄₆ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₄₅ puede ser Phe o Tyr, y/o Xaa₄₆ puede ser Met o Ile.

En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XII):

10 G-Y-S-F-T-Xaa₄₇-Y-Xaa₄₈-M-H (XII) (SEC ID N°: 72)
 en la que Xaa₄₇ a Xaa₄₈ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₄₇ puede ser Gly o Ala, y/o Xaa₄₈ puede ser Phe o Tyr.

15 En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XIII):

G-Y-S-F-T-Xaa₄₉-Y-Y-Xaa₅₀-H (XIII) (SEC ID N°: 73)
 en la que Xaa₄₉ a Xaa₅₀ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₄₉ puede ser Gly o Ala, y/o Xaa₅₀ puede ser He o Met.

En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XIV):

25 G-Y-Xaa₅₁-F-T-Xaa₅₂-Y-Xaa₅₃-Xaa₅₄-Xaa₅₅ (XIV) (SEC ID N°: 74)
 en la que Xaa₅₁ a Xaa₅₅ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₅₁ puede ser Val o Ser, y/o Xaa₅₂ puede ser Thr, Gly o Ala, y/o Xaa₅₃ puede ser Ser, Tyr o Phe, y/o Xaa₅₄ puede ser Ile o Met, y/o Xaa₅₅ puede ser Tyr o His.

30 En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XV):

G-Y-S-Xaa₅₆-T-Xaa₅₇-G-Y-Xaa₅₈-Xaa₅₉-H (XV) (SEC ID N°: 75)
 en la que Xaa₅₆ a Xaa₅₉ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₅₆ puede ser Ile o Phe, y/o Xaa₅₇ puede ser una delección o Ser, y/o Xaa₅₈ puede ser Ser, Tyr o Phe, y/o Xaa₅₉ puede ser Trp, Ile o Met.

En un aspecto, HCDR1 es de fórmula (XVI):

40 G-Y-Xaa₆₀-Xaa₆₁-T-Xaa₆₂-Xaa₆₃-Y-S-Xaa₆₄-Xaa₆₅ (XVI) (SEC ID N°: 76)
 en la que Xaa₆₀ a Xaa₆₅ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₆₀ puede ser Val o Ser y/o Xaa₆₁ puede ser Phe o He y/o Xaa₆₂ puede ser Thr o Ser y/o Xaa₆₃ puede ser delección o Gly y/o Xaa₆₄ puede ser Ile o Trp y/o Xaa₆₅ puede ser Tyr o His.

En un aspecto, HCDR2 es de fórmula (XVII):

50 R-I-N-P-Y-Xaa₆₆-G-A-T-S-Xaa₆₇-N-Xaa₆₈-N-F-K-D (XVII) (SEC ID N°: 77)
 en la que Xaa₆₆ a Xaa₆₈ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que Xaa₆₆ puede ser Asn o Tyr y/o Xaa₆₇ puede ser delección o Tyr y/o Xaa₆₈ puede ser Arg o Gln.

En un aspecto, HCDR2 es de fórmula (XVIII):

55 R-I-N-P-Y-Xaa₆₆-G-A-T-S-Y-N-Q-N-F-K-D (XVIII) (SEC ID N°: 78)
 en la que Xaa₆₆ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que en la que Xaa₆₆ puede ser Asn o Tyr

En un aspecto, HCDR2 es de fórmula (XIX):

60 R-I-N-P-Y-N-G-A-T-S-Y-N- Xaa₆₈-N-F-K-D (XIX) (SEC ID N°: 79)
 65 en la que Xaa₆₈ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una delección o inserción, preferentemente, en la que en la que Xaa₆₈ puede ser Arg o Gln.

En un aspecto, HCDR2 es de fórmula (XX):

5 Y-I-Xaa₆₉-Xaa₇₀-Y-Xaa₇₁-G-Xaa₇₂-T-Xaa₇₃-Y-N-Xaa₇₄-Xaa₇₅-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Xaa₇₈ (XX) (SEC ID N°: 80)
 en la que Xaa₆₉ a Xaa₇₈ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₆₉ puede ser Asp o His y/o Xaa₇₀ puede ser una deleción o Pro y/o Xaa₇₁ puede ser Ser o Asn y/o Xaa₇₂ puede ser Ile o Asp y/o Xaa₇₃ puede ser Ser o Asn y/o Xaa₇₄ puede ser Gln o Pro y/o Xaa₇₅ puede ser Lys o Ser y/o Xaa₇₆ puede ser Phe o Leu y/o Xaa₇₇ puede ser Lys o Arg y/o Xaa₇₈ puede ser Gly o Ser.

10 En un aspecto, HCDR2 es de fórmula (XXI):

Xaa₇₉-I-Xaa₈₀-Xaa₈₁-Y-Xaa₈₂-G-Xaa₈₃-T-Xaa₈₄-Xaa₈₅-N-Xaa₈₆-Xaa₈₇-Xaa₈₈-Xaa₈₉-Xaa₉₀ (XXI) (SEC ID N°: 81)
 15 en la que Xaa₇₉ a Xaa₉₀ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₇₉ puede ser Arg o Tyr y/o Xaa₈₀ puede ser Asn, Asp o His y/o Xaa₈₁ puede ser una deleción o Pro y/o Xaa₈₂ puede ser Tyr, Asn o Ser y/o Xaa₈₃ puede ser Ile, Asp o Ala y/o Xaa₈₄ puede ser Ser o Asn y/o Xaa₈₅ puede ser una deleción o Tyr y/o Xaa₈₆ puede ser Pro, Arg o Gln y/o Xaa₈₇ puede ser Ser, Lys o Asn y/o Xaa₈₈ puede ser Phe o Leu y/o Xaa₈₉ puede ser Lys o Arg y/o Xaa₉₀ puede ser Asp o Gly.

20 En un aspecto, HCDR3 es de fórmula (XXII):

Xaa₉₁-Xaa₉₂-G-Xaa₉₃-Xaa₉₄-Y-Xaa₉₅-F-D-Y (XXII) (SEC ID N°: 82)
 25 en la que Xaa₉₁ a Xaa₉₅ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₉₁ puede ser Asp o Ser, y/o Xaa₉₂ puede ser Asp o Gly, y/o Xaa₉₃ puede ser Gly o Asn, y/o Xaa₉₄ puede ser Asn o Thr, y/o Xaa₉₅ puede ser Pro o una deleción.

En un aspecto, HCDR3 es de fórmula (XXIII):

30 Xaa₉₆-Xaa₉₇-Xaa₉₈-Xaa₉₉-Xaa₁₀₀-Y-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-D-Y (XXIII) (SEC ID N°: 83)
 en la que Xaa₉₆ a Xaa₁₀₂ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₉₆ puede ser S o D, y/o Xaa₉₇ puede ser G, T D, y/o Xaa₉₈ puede ser G, K o una deleción, y/o Xaa₉₉ puede ser G, L, N o una deleción, y/o Xaa₁₀₀ puede ser Y, T, G, N, y/o Xaa₁₀₁ puede ser P, G o una deleción, y/o Xaa₁₀₂ puede ser M, F o L.

En un aspecto, HCDR3 es de fórmula (XXIV):

40 Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Xaa₁₀₅-Xaa₁₀₆-Xaa₁₀₇-Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-F-D-Y (XXIV) (SEC ID N°: 84)
 en la que Xaa₁₀₃ a Xaa₁₀₉ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₁₀₃ puede ser Asp, Ser, Glu, y/o Xaa₁₀₄ puede ser Asp o Gly, y/o Xaa₁₀₅ puede ser Gly o Asn, y/o Xaa₁₀₆ puede ser Asn, Tyr o Gly, y/o Xaa₁₀₇ puede ser Asn, Thr o Tyr, y/o Xaa₁₀₈ puede ser Tyr o Gly, y/o Xaa₁₀₉ puede ser Tyr, Pro o una deleción.

45 En un aspecto, HCDR3 es de fórmula (XXV):

Xaa₁₁₀-G-Xaa₁₁₁-Xaa₁₁₂-Y-Xaa₁₁₃-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-D-Y (XXV) (SEC ID N°: 85)
 50 en la que Xaa₁₁₀ a Xaa₁₁₅ puede ser una sustitución conservativa o no conservativa o una deleción o inserción, preferentemente, en la que Xaa₁₁₀ puede ser Glu o Asp, y/o Xaa₁₁₁ puede ser Asn o una deleción, y/o Xaa₁₁₂ puede ser Tyr o una deleción, y/o Xaa₁₁₃ puede ser Tyr, o Gly, y/o Xaa₁₁₄ puede ser Tyr o Gly, y/o Xaa₁₁₅ puede ser Met o Phe.

55 En un aspecto, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una cadena ligera que comprende:

- a una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena ligera (LCDR1) seleccionada de SEC ID N°: 61, 64 y 65; y/o
- 60 b una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera (LCDR2) seleccionada de SEC ID N°: 62, 66 y 67; y/o
- c una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena ligera (LCDR3) seleccionada de SEC ID N°: 63, 68, 69 y 70.

En un aspecto, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una cadena pesada que comprende:

65

a una secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) seleccionada de SEC ID N°: 71 a 76;
y/o

b una secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) seleccionada de SEC ID N°: 77 a 81;
y/o

5 c una secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) seleccionada de SEC ID N°: 82 a 85.
Anticuerpo 29H3

Se han depositado células productoras del anticuerpo 29H3 en la CNCM bajo el número de acceso I-4187; también se ha secuenciado el anticuerpo 29H3. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se enumera SEC ID N°: 10, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se enumera SEC ID N°: 11. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran en SEC ID N° 53 y 54, respectivamente. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 29H3; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 29H3. En cualquier aspecto de la divulgación, el anticuerpo 29H3 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 29H3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de 29H3. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de la cadena pesada de 29H3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de 29H3 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de la cadena ligera de 29H3. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de las cadenas ligeras o pesadas puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas que comprenden parte o toda una región de unión al antígeno del anticuerpo 29H3 está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es 29H3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 12, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 13, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 14, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 15, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 16, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y/o una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 17, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene cada una al menos tres CDR, en el que una, dos o tres de las al menos tres CDR tiene la secuencia de SEC ID N°: 12 a 14 y 15 a 17 para las cadenas pesadas y ligeras respectivas, y anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en condiciones ácidas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, que comprende:

a la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 10, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

50 b la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 11, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

c la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 10, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 11, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

55 d las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 12, 13 y 14, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

e las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de las cadenas ligeras (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 15, 16 y 17, respectivamente, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

60 f las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 12, 13 y 14, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 15, 16 y 17, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

65

g la región variable de la cadena pesada que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

h la región variable de la cadena ligera que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la SEC ID N° correspondiente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite para la unión de TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), anteriormente.

Anticuerpo 31C3

Se han depositado células productoras del anticuerpo 31C3 en la CNCM bajo el número de acceso I-4186, además también se ha secuenciado el anticuerpo 31C3. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se enumera SEC ID N°: 2, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se enumera SEC ID N°: 3. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran en SEC ID N° 51 y 52, respectivamente. En un aspecto específico, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 31C3; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 31C3. En cualquier aspecto de la divulgación, el anticuerpo 31C3 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 31C3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de 31C3. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de la cadena pesada de 31C3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de 31C3 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de la cadena ligera de 31C3. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de las cadenas ligeras o pesadas puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas que comprenden parte o toda una región de unión al antígeno del anticuerpo 31C3 está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es 31C3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 4, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 5, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 6, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 7, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 8, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 9, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene cada una al menos tres CDR, en el que una, dos o tres de las al menos tres CDR tiene la secuencia de SEC ID N°: 4 a 6 y 7 a 9 para las cadenas pesadas y ligeras respectivas, y anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en condiciones ácidas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, que comprende:

a la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 2, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

b la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 3, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

c la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 2, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 3, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

d las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 y 2 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2) como se muestra en SEC ID N°: 4 y 5, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente, opcionalmente en las que la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos

de las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 4, 5 y 6, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

e las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 7, 8 y 9, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

f las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 4, 5 y 6, en las que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 7, 8 y 9, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

g la región variable de la cadena pesada que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o

h la región variable de la cadena ligera que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la SEC ID N° correspondiente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite para la unión de TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), anteriormente.

Anticuerpo 23C8

Se ha secuenciado el anticuerpo 23C8. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se enumera SEC ID N°: 26, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se enumera SEC ID N°: 27. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran en SEC ID N° 57 y 58, respectivamente. En un aspecto específico, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 23C8; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 23C8. En cualquier aspecto de la divulgación, el anticuerpo 23C8 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 23C8. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de 23C8. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de la cadena pesada de 23C8. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de 23C8 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de la cadena ligera de 23C8. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de las cadenas ligeras o pesadas puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas que comprenden parte o toda una región de unión al antígeno del anticuerpo 23C8 está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es 23C8.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 28, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 29, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 30, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 31, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 32, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 33, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene cada una al menos tres CDR, en el que una, dos o tres de las al menos tres CDR tiene la secuencia de SEC ID N°: 28 a 30 y 31 a 33 para las cadenas pesadas y ligeras respectivas, y anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en condiciones ácidas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, que comprende:

- a la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 26, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- b la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 27, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 5 c la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 26, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 27, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 10 d las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 y 2 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2) como se muestra en SEC ID N°: 28 y 29, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; opcionalmente en las que la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 28, 29 y 30, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 15 e las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 31, 32 y 33, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 20 f las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 28, 29 y 30, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 31, 32 y 33, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 25 g la región variable de la cadena pesada que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- h la región variable de la cadena ligera que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 % 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la SEC ID N° correspondiente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite para la unión de TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), anteriormente.

35 Anticuerpo 28F11

Se ha secuenciado el anticuerpo 28F11. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se enumera SEC ID N°: 18, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se enumera SEC ID N°: 19. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran en SEC ID N° 55 y 56, respectivamente. En un aspecto específico, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 28F11; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 28F11. En cualquier aspecto de la divulgación, el anticuerpo 28F11 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 28F11. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de 28F11. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de la cadena pesada de 28F11. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de 28F11 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de la cadena ligera de 28F11. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de las cadenas ligeras o pesadas puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas que comprenden parte o toda una región de unión al antígeno del anticuerpo 28F11 está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es 28F11.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 20, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 21, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 22, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 23, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 24, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente;

una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 25, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

5 En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene cada una al menos tres CDR, en el que una, dos o tres de las al menos tres CDR tiene la secuencia de SEC ID N°: 20 a 22 y 23 a 25 para las cadenas pesadas y ligeras respectivas, y anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en condiciones ácidas.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, que comprende:

- a la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 18, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- b la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 19, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 15 c la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 18, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 19, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- d las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 y 2 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2) como se muestra en SEC ID N°: 20 y 21, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; opcionalmente en las que cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 20, 21 y 22, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 20 e las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 23, 24 y 25, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 25 f las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 20, 21 y 22, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 23, 24 y 25, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 30 g la región variable de la cadena pesada que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- 35 h la región variable de la cadena ligera que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

40 En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la SEC ID N° correspondiente.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite para la unión de TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), anteriormente.

Anticuerpo 34A3

50 Se ha secuenciado el anticuerpo 34A3. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se enumera SEC ID N°: 34, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se enumera SEC ID N°: 35. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran en SEC ID N° 59 y 60, respectivamente. En un aspecto específico, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 34A3; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno del anticuerpo 34A3. En cualquier aspecto de la divulgación, el anticuerpo 34A3 puede caracterizarse por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 34A3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de la cadena pesada de 34A3. Según un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de la cadena pesada de 34A3. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de la cadena ligera variable de 34A3 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de la cadena ligera de 34A3. Opcionalmente, una cualquiera o más de dichas CDR de las cadenas ligeras o pesadas puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de las cadenas ligeras y/o pesadas que comprenden parte o toda una región de unión al antígeno del anticuerpo 34A3 está fusionada con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otro aspecto preferido, el anticuerpo es 34A3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido purificado que codifica un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 36, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 37, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 38, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 39, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 40, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 41, en la que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene cada una al menos tres CDR, en el que una, dos o tres de las al menos tres CDR tiene la secuencia de SEC ID N°: 36 a 38 y 29 a 41 para las cadenas pesadas y ligeras respectivas, y anticuerpo que se une específicamente a TLR3 en condiciones ácidas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a TLR3 humano, que comprende:

- a la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 34, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- b la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 35, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- c la región variable de la cadena pesada de SEC ID N°: 34, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N°: 35, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- d las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 36, 37 y 38, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- e las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 39, 40 y 41, en las que uno o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- f las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 36, 37 y 38, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 39, 40 y 41, en las que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- g la región variable de la cadena pesada que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente; o
- h la región variable de la cadena ligera que es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % idéntica a la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35, en la que uno, dos, tres o más de estos aminoácidos puede estar sustituido con un aminoácido diferente.

En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas pesada y ligera puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencias con la CDR particular o conjunto de CDR enumeradas en la SEC ID N° correspondiente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite para la unión de TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), anteriormente.

En cualquiera de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, las secuencias de la región variable especificada y de CDR pueden comprender modificaciones de secuencia conservativas. Modificaciones de secuencia conservativas se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la divulgación por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas normalmente son aquellas en las que un residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. Las secuencias de la región variable especificada y de CDR pueden comprender una, dos, tres, cuatro o más inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Si se hacen las sustituciones, sustituciones preferidas serán modificaciones conservativas. Se han definido en la materia familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido

aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación pueden sustituirse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede probarse para la función retenida (es decir, las propiedades expuestas en el presente documento) usando los ensayos descritos en el presente documento.

El término "identidad" o "idénticas", cuando se usa en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de vinculación de secuencias entre polipéptidos, como se ha determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre las más pequeñas de dos o más secuencias con alineamientos con huecos (si los hay) tratados por un modelo matemático particular o programa informático (es decir, "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

Métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos de determinación de la identidad se describen en programas informáticos públicamente disponibles. Métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., arriba). También puede usarse el muy conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Las secuencias de las CDR de los anticuerpos según la divulgación, según los sistemas de definiciones de AbM (definición del software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM), Kabat y Chotia, se han resumido en la Tabla A más adelante. Las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento están numeradas según los sistemas de numeración de Abm, Kabat y Chotia. Aunque puede usarse cualquier sistema de numeración adecuado para regiones CDR designadas, en ausencia de cualquier otra indicación, la numeración usada en el presente documento es Abm. Tal numeración se ha establecido usando las siguientes indicaciones: CDR-L1: Inicio: aprox. residuo 24, residuo antes: siempre una Cys, residuo después: siempre un Trp (normalmente Trp-Tyr-Gln, pero también Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu), longitud: 10 a 17 residuos; CDR-L2: Inicio: siempre 16 residuos después del extremo de L1, Residuos antes: generalmente Ile-Tyr (pero también Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe), Longitud: siempre 7 residuos; CDR-L3, Inicio: siempre 33 residuos después del extremo de L2, Residuo antes: siempre Cys, Residuos después: siempre Phe-Gly-Xaa-Gly, Longitud: 7 a 11 residuos; CDR-H1, Inicio: aprox. residuo 26 (siempre 4 después de una Cys) (definición de Chotia / AbM, la definición de Kabat se inicia 5 residuos después), Residuos antes: siempre Cys-Xaa-Xaa-Xaa, Residuos después: siempre un Trp (normalmente Trp-Val, pero también Trp-Ile, Trp-Ala), Longitud: 10 a 12 residuos (definición de AbM, la definición de Chotia excluye los 4 últimos residuos); CDR-H2, Inicio: siempre 15 residuos después del extremo de Kabat / definición de AbM de CDR-H1, Residuos antes: normalmente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (pero varias variaciones, Residuos después de Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala), Longitud: definición de Kabat 16 a 19 residuos; la definición de AbM (y Chotia) termina 7 residuos después; CDR-H3, Inicio: siempre 33 residuos después del extremo de CDR-H2 (siempre 2 después de una Cys), Residuos antes: siempre Cys-Xaa-Xaa (normalmente Cys-Ala-Arg), Residuos después: siempre Trp-Gly-Xaa-Gly, Longitud: 3 a 25 residuos.

Las secuencias de las cadenas variables de los anticuerpos según la divulgación se enumeran en la Tabla B a continuación, la secuencia de péptidos señal se representa en cursiva y las CDR se proporcionan en negrita. El término x/x indica que cualquiera de los dos aminoácidos indicados puede estar presente en el residuo de aminoácido particular, por ejemplo, el término F/S significa que en la posición dada, el aminoácido puede ser tanto fenilalanina como serina. En cualquier aspecto en el presente documento, una secuencia de VL o VH puede especificarse o numerarse de manera que contenga o carezca del péptido señal o cualquier parte del mismo.

En un aspecto, los anticuerpos de la divulgación son del isotipo IgG1 humano o de ratón. En otro aspecto, los anticuerpos de la divulgación son del isotipo IgG4 humano. En un aspecto, los anticuerpos de la divulgación son fragmentos de anticuerpos que retienen sus propiedades de unión y/o funcionales.

Tabla A

mAb	Definición de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEC ID	Secuencia	SEC ID	Secuencia	SEC ID	Secuencia
23C8	Abm	28	GYSFTIGYFMH	29	RINPYNGATS	30	DDGGNYPFDY
	Chotia		GYSFTG		RINPYNGATS		DDGGNYPFDY
	Kabat		GYFMH		RINPYNGATSYNQNF		DDGGNYPFDY
29H3	Abm	12	GYSITSGY\$W	13	KD YIHYSGITN	14	DGYYGMDY
	Chotia		H GYSITSG		YIHYSGITN		DGYYGMDY
28F11	Kabat		SGYS\$WH		YIHYSGITNPNPSLRS		DGYYGMDY
	Abm	20	GYSFTGYI\$H	21	RINPYYGAT	22	STKLGILDY
	Chotia		GYSFTG		RINPYYGAT		STKLGILDY
31C3	Kabat		GYI\$H		RINPYYGATS\$NQNFK		STKLGILDY
	Abm	4	GYSFTAYYMH	5	D RINPYNGATS	6	SGGNTYFDY
34A3	Chotia		GYSFTA		RINPYNGATS		SGGNTYFDY
	Kabat		AYYMH		RINPYNGATSYNRNF		SGGNTYFDY
	Abm	36	GYVFTTYSIY	37	KD YIDPYNGDTS	38	EGNYYGYFDY
	Chotia		GYVFTT		YIDPYNGDTS		EGNYYGYFDY
	Kabat		TYSIY		YIDPYNGDTSYNQKF		EGNYYGYFDY
					KG		

Tabla B

Porción de anticuerpo	SEC ID N°	
23C8 VL	27	MSVPTQVLGL LLLWLTGARC DIQMIOQSPAS LSASVGEIVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYY AKTLAEGVPS RFGSGGTGQ FSLKINSIQP EDFGSYVCOH HYGTPYTFGG GTKLEIK MGMSWIFLFL LSGTAGVLSV VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGYSTFG
23C8 VH	26	YFMHWVKQSH VKSLEWIGRI NPYNGATSYN QNFKDKASLI VDKSSSTSYM ELHSLTSEDS AVYVCVDDG GNPFDYWGQ GTLLTVS MSVPTQVLGL LLLWLTGARC DIQMIOQSPAS LSASVGEIVT ITCRASENIY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYN AKTLAEGVPS RFGSGSGTQ YFLKINSIQP
28F11 VL	19	EDFGSYVCOH HYGTPYTFGG GTKLEIK MGMSWIFLFL LSGTAGVLSV VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKASGYSTFG
28F11 VH	18	YYIHWVKQSH VKSLEWIGRI NPYNGATSYN NFKDKANLTV DKSSSTAYME LHSLTSEDSA VYICARSTKL GYLDYWGQGT TLLTVS MDFQVQVVF VLLWLSGVDG DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS ITCRASQAVR
29H3 VL	11	TSVAWYQQKP GQSPKALIYL ASNRHTGVDP RFTGSGSCTD FLLTVSNIQS EDLADYFCIQ HMYPTFFGG GTKLEIK MRVLLILGLF TAFPGILSDV QIQESGPDV RFSQSLSLTC TVIGYSITSG
29H3 VH	10	YSWHWIRQFL GNKLEWNGYI HYSGITVYNP SLRSRISFTR DTSKNQFFLQ LNSVTIEDTA IYICARDGYI GNDYWGQGT VIVS MSVPTQVLGL LLLWLTGARC DIQMIOQSPAS LSASVGEIVT ITCRASENIY
31C3 VL	3	SSLAWYQQKQ GKSPQLLVYN AKTLAEGVPS RFGSGSGTQ F/SSLKINSIQP EDFGTYVCOH HYGTPYTFGG GTKLEIK MGMSWIFLFL LSGTAGVLSV VQLQQSGPEL VKPGASVKIS CKPFGYSFTA
31C3 VH	2	YFMHWVKQSH VKSLEWIGRI NPYNGATSYN RNFKDKASLI VDKSSSTAYM ELHSLTSEDS AVYICARSGG NTYFDYWGQ TLLTVS
34A3 VL	35	MDFQVQVVF LMSASVIMS RQIIVLTQSP ALMSASPGEK VMTCSASSSV SYMFWYQQKP RSSPKPWLYL TSNLASGVPA RFGSGSGTGS YSLTISSMEA EDAATYVCOQ WFGNPTFFGG GTKLEIK

<p>Porción de anticuerpo 34A3 VH</p>	<p>SEC ID N° 34</p>	<p>MEWRWIFLFL LSGTTGVHSE IQLQSGPEL VKPGASVKVS CKASGYVFTT YSIYWVKQSH GKSLEWIGYI DPYNGDTSYN QKFKGKATLT VDKSSSTAYM HLNSLTSEDS TVYYCAREGN YGYFDYWGQ GTLLIVS</p>
--	-------------------------	---

ES 2 543 095 T3

- 5 La secuenciación de cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos anti-TLR3 según la divulgación condujo a la identificación del reordenamiento de genes que participa en la generación de tales anticuerpos, como se resume en la Tabla C a continuación (las secuencias de genes indicadas pueden recuperarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>). Las Figuras 18A y 18B representan los árboles filogenéticos (generados por Philip's Drawtree) de las cadenas ligeras y pesadas, que indican un alto grado de homología entre los anticuerpos 28F11, 31C3 y 23C8.

Tabla C

	Cadena ligera		Cadena pesada	
	Gen V	Gen J	Gen V	Gen J
29H3	VK 19-14	JK2	VH3 VH36-60.a1.85	JH4
	SEC ID N°: 42	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 46	SEC ID N°: 50
34A3	VK aq4 (VK)	JK2	VH1 VH J558.1	JH2
	SEC ID N°: 43	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 47	SEC ID N°: 49
23C8	VK 12-41 o 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	SEC ID N°: 44	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 48	SEC ID N°: 49
31C3	VK 12-41 o 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	SEC ID N°: 44	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 48	SEC ID N°: 49
28F11	VK 12-41 o 12-44	JK2	VH1 VH J558.2	JH2
	SEC ID N°: 44	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 48	SEC ID N°: 49

- 10 La Tabla D a continuación proporciona el porcentaje de identidad de secuencias entre las diferentes CDR para cada anticuerpo, en aminoácidos.

Tabla D

CDR VL					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	33,33	88,89	92,59	37,04
29H3		100,00	33,33	29,63	29,63
23C8			100,00	88,89	33,33
28F11				100,00	33,33
34A3					100,00
CDR1 VL					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	45,45	90,91	90,91	27,27
29H3		100,00	45,45	27,27	27,27
23C8			100,00	90,91	27,27
28F11				100,00	36,36
34A3					100,00
CDR2 VL					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	14,29	85,71	100,00	28,57
29H3		100,00	14,29	14,29	42,86
23C8			100,00	85,71	28,57
28F11				100,00	28,57
34A3					100,00
CDR3 VL					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	33,33	88,89	85,71	33,33
29H3		100,00	44,44	27,27	22,22
23C8			100,00	88,89	44,44
28F11				100,00	44,44
34A3					100,00
CDR VH					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	39,47	78,38	70,27	50,00
29H3		100,00	44,74	39,47	39,47
23C8			100,00	70,27	52,63
28F11				100,00	47,37
34A3					100,00
CDR1 VH					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	54,55	80,00	80,00	45,45

CDR VL					
29H3		100,00	63,64	63,64	45,45
23C8			100,00	80,00	45,45
28F11				100,00	54,55
34A3					100,00
CDR2 VH					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	35,29	94,12	82,35	64,71
29H3		100,00	35,29	29,41	35,29
23C8			100,00	88,24	70,59
28F11				100,00	58,82
34A3					100,00
CDR3 VH					
	31C3	29H3	23C8	28F11	34A3
31C3	100,00	40,00	50,00	44,44	40,00
29H3		100,00	40,00	30,00	40,00
23C8			100,00	30,00	30,00
28F11				100,00	20,00
34A3					100,00

La Tabla E proporciona el porcentaje de identidad que se ha calculado entre las diferentes secuencias de nucleótidos de VL y VH (cursiva) para cada anticuerpo usando el software LALIGN.

Tabla E

VH \ VL	23C8	28F11	29H3	31C3	34A3
23C8	100	93,5	60,6	94,9	87,3
28F11	97,6	10	60,4	94,4	87,8
29H3	65,8	65,2	100	61,0	60,6
31C3	96,1	95,5	63,9	100	89,1
34A3	64,6	65,3	67,2	64,0	100

5 La Tabla F proporciona el porcentaje de identidad que se ha calculado entre las diferentes secuencias de nucleótidos de VL y VH (cursiva) usando el software LALIGN.

Tabla F

VH \ VL	23C8	28F11	29H3	31C3	34A3
23C8	100	89,8	48,9	92,7	79,1
28F11	94,5	100	47,0	91,2	79,6
29H3	54,3	54,3	100	47,8	48,1
31C3	96,1	95,3	55,1	100	79,6
34A3	52,7	53,5	55,4	54,3	100

10 Fragmentos y derivados de los presentes anticuerpos monoclonales

Los fragmentos y derivados de anticuerpos de la presente divulgación (que están englobados por el término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en la presente solicitud, a menos que se establezca de otro modo o se contradiga claramente por el contexto), preferentemente un anticuerpo de tipo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, pueden producirse por técnicas que se conocen en la técnica. Los "fragmentos" comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión al antígeno o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia sin interrumpir de residuos de aminoácidos contiguos (denominada en el presente documento un "fragmento de anticuerpo monocatenario" o "polipéptido monocatenario"), que incluye sin limitación (1) moléculas de Fv monocatenario (2) polipéptidos monocatenarios que contienen solo un dominio variable de la cadena ligera, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDR del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos monocatenarios que contienen solo una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de los presentes anticuerpos pueden obtenerse usando métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab o F(ab')₂ por digestión con proteasa de los anticuerpos aislados, según técnicas convencionales. Se apreciará que los fragmentos inmunorreactivos pueden modificarse usando métodos conocidos, por ejemplo, para ralentizar la eliminación *in vivo* y obtener un perfil farmacocinético más deseable el fragmento

puede modificarse con polietilenglicol (PEG). Métodos para acoplar y conjugar de forma específica de sitio PEG con un fragmento Fab' se describen en, por ejemplo, Leong et al., 16 (3): 106-119 (2001) y Delgado et al., Br. J. Cancer 73 (2): 175-182 (1996).

5 Alternativamente, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la divulgación, preferentemente un anticuerpo de tipo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, puede modificarse de manera que codifique un fragmento de la divulgación. Entonces, el ADN modificado se inserta en un vector de expresión y se usa para transformar o transfectar una célula apropiada, que entonces expresa el fragmento deseado.

10 En ciertos aspectos, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la presente divulgación, preferentemente un anticuerpo de tipo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, puede modificarse antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de las secuencias no humanas homólogas (por ejemplo, Morrison et al., PNAS pp. 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante por un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos
15 "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Normalmente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos con los dominios constantes de un anticuerpo de la divulgación.

Así, según otro aspecto, el anticuerpo de la presente divulgación, preferentemente un anticuerpo de tipo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, es humanizado. Las formas "humanizadas" de los anticuerpos según la presente divulgación son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina murina. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la
20 complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) mientras que se mantiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo original.

En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana pueden sustituirse con
30 residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en ni el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR importadas o de la región estructural. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellas del anticuerpo
35 original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992); Verhoeven et Science, 239, pp. 1534; y la patente de EE.UU. n° 4.816.567. Los métodos para humanizar los anticuerpos de la presente divulgación son muy conocidos en la técnica.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de la presente divulgación se criba contra la biblioteca
45 entera de secuencias del dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del ratón se acepta entonces como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); Chotia y Lesk, J. Mol. 196, pp. 901). Otro método usa una región estructural particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al.,
50 PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta et J. Immunol., 51, p. 1993)).

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por los receptores TLR3 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están
55 comúnmente disponibles modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas expresiones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse residuos FR y combinarse de las secuencias consenso y de importación de manera que se logre la característica del anticuerpo deseado, tal como elevada afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR participan directamente y más sustancialmente en influir en la unión del antígeno.
60

65

Otro método de preparación de anticuerpos monoclonales "humanizados" es usar un XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón usado para la inmunización. Un XenoMouse es un huésped murino según la presente divulgación que ha sustituido sus genes de inmunoglobulina con genes de inmunoglobulina humana funcionales. Así, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas preparados a partir de los linfocitos B de este ratón ya están humanizados. El XenoMouse se describe en la patente de Estados Unidos nº 6.162.963.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse según diversas otras técnicas, tales como usando, para inmunización, otros animales transgénicos que se han manipulado para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz et Nature 362 (1993) 255), o por selección de repertorios de anticuerpos usando métodos de expresión en fago. Tales técnicas son conocidas para el experto y pueden implementarse a partir de anticuerpos monoclonales como se desvela en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente divulgación, preferentemente un anticuerpo similar a 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3, también pueden convertirse en anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la(s) cadena(s) pesada(s)/ligera(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada y especificidad de unión (Cabilly et al., arriba; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., pp. 6851 (1984)).

Aunque los presentes anticuerpos tienen la capacidad de unirse a TLR3 y opcionalmente inhibir adicionalmente la señalización de TLR3, también pueden usarse para otros fines tales como conjugación con una toxina que es útil para células de destrucción dirigida que expresan polipéptidos TLR3, por ejemplo, ciertas células tumorales tales como melanomas o aquellas de mama, pulmón, esófago, estómago, laringe, riñón o cuello uterino, o posiblemente células viralmente infectadas o células que participan en inflamación. En tales aspectos, normalmente se obtiene una muestra (por ejemplo, una biopsia para tumores) se realizará inicialmente para evaluar si las células (por ejemplo, células tumorales, células infectadas, células que participan en inflamación, etc.) expresan TLR3, por ejemplo, usando los métodos de detección descritos en el presente documento. Si TLR3 se detecta de hecho sobre la superficie de las células tumorales, entonces pueden administrarse anticuerpos citotóxicos. Entonces, los anticuerpos citotóxicos se internalizan por la célula y la toxina se libera dentro de la célula, destruyendo selectivamente esa célula. Por tanto, tales anticuerpos se usarán en métodos de tratamiento de cánceres y tumores, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de las vías biliares; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico (estómago); neoplasias intraepiteliales; leucemias; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, célula pequeña y célula no pequeña); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer pancreático; cáncer de próstata; cáncer rectal; cáncer renal (riñón); sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; además de otros carcinomas y sarcomas. Los cánceres pueden ser primarios o metastásicos.

Un enfoque eficaz para potenciar la potencia antitumoral de anticuerpos implica enlazar fármacos citotóxicos o toxinas con mAb que pueden ser internalizados por una célula diana. Estos agentes se llaman conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) e inmunotoxinas, respectivamente. Tras la administración a un paciente, los ADC e inmunotoxinas se unen a células diana mediante sus porciones de anticuerpo y se internalizan, permitiendo que los fármacos o toxinas ejerzan su efecto. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº US2005/0180972 A1, US2005/0123536 A1. Véase, por tanto, por ejemplo, Hamblett et al., Clin Canc Res, 10:7063-7070, Oct. 15, 1999, Law et al., Clin Canc Res, 10:7842-7851, Dec. 1, 2004, Francisco et al., Neoplasia, 102(4):1458-1465, Aug. 15, 2003, Russell et al., Clin Canc Res, 11:843-852, Jan. 15, 2005, Doronina et al., Nat Biotech, 21(7):778-784, July 2003.

Pueden prepararse anticuerpos citotóxicos usando técnicas descritas (Carter et al., Cancer Journal, Volumen 14, Número 3, May/June 2008, o Ravi et al., Accounts of Chemical Research 98-107 January 2008 Vol. 41, No. 1).

Péptidos tóxicos o citotóxicos preferidos o moléculas pequeñas incluyen cualquier compuesto que pueda ralentizar, detener o invertir la proliferación de células, disminuir su actividad de cualquier forma detectable, o destruirlas directa o indirectamente. Preferentemente, los compuestos tóxicos o citotóxicos funcionan destruyendo directamente las células, provocando ADCC o de otro modo. Como se usa en el presente documento, un péptido tóxico puede incluir cualquier péptido, polipéptido, o derivado de tal, que incluye derivados de péptidos o polipéptidos con aminoácidos no naturales o enlaces modificados. Una molécula pequeña tóxica puede incluir cualquier compuesto o elemento tóxico, preferentemente con un tamaño inferior a 10 kD, 5 kD, 1 kD, 750 D, 600 D, 500 D, 400 D, 300 D, o más pequeño.

La conjugación con un resto detectable es útil, entre otras cosas, cuando un anticuerpo de la divulgación se usa para fines de diagnóstico. Tales fines incluyen, pero no se limitan a, ensayar muestras biológicas, por ejemplo, una muestra de sangre o biopsia de tejido, para la presencia de células que expresan TLR3, y detectar la presencia, nivel o actividad de células que expresan TLR3 en un individuo. Tal ensayo y métodos de detección pueden usarse en los métodos de diagnóstico/ terapéuticos de la divulgación, por ejemplo, que implican detectar la expresión de

TLR3 en células de un paciente y si se determina que las células del paciente expresan TLR3, administrar posteriormente un anticuerpo modulador de TLR3 de la divulgación.

En ciertos aspectos, los presentes anticuerpos se usan para purificar células que expresan TLR3 de una muestra biológica. Pueden obtenerse muestras biológicas de un paciente, por ejemplo, para fines de diagnóstico o terapéuticos *ex vivo*, o de individuos o primates no humanos para obtener una fuente de tales células para fines de investigación.

En un aspecto tal, los anticuerpos marcados de la divulgación pueden usarse en clasificación FACS para purificar o aislar células que expresan TLR3 de una muestra biológica. Alternativamente, en algunos aspectos, la conjugación de un anticuerpo de la presente divulgación con un soporte sólido puede ser útil como herramienta para la purificación por afinidad de células que llevan un receptor TLR3 sobre su superficie celular de una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o células de una biopsia de tejido de un individuo. Este método de purificación es otro aspecto alternativo de la presente divulgación, ya que es la población de células purificada resultante.

Independientemente del método usado para aislar o purificar las células que expresan TLR3, la capacidad de hacer esto es útil para numerosos fines, por ejemplo, para diagnosticar un trastorno asociado a TLR3 evaluando el número o actividad de células que expresan TLR3, por ejemplo, antes de la administración de anticuerpos anti-TLR3 como se describe en el presente documento. Además, las células que expresan TLR3 purificadas son útiles en un contexto de investigación, por ejemplo, para caracterizar mejor las células y sus diversas propiedades y comportamientos, además de para identificar compuestos o métodos que pueden usarse para modular su comportamiento, actividad, supervivencia o proliferación.

Composiciones y usos en terapia, diagnósticos y pronósticos

Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos de la divulgación son particularmente eficaces en modular la actividad de células que expresan TLR3 que comprenden los polipéptidos y, por consiguiente, la actividad o comportamiento de las células que expresan los polipéptidos, por ejemplo, células inmunitarias que expresan TLR3, CD, CD mieloides, etc. En ciertos aspectos, los anticuerpos inhiben TLR3, por ejemplo, bloqueando la señalización de TLR3, opcionalmente sin bloquear la interacción de un antígeno o ligando tal como ARNbc con el receptor, inhibiendo así la proliferación o activación de las células. La composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones también se denominan "composiciones de anticuerpo" de la divulgación. En un aspecto, las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación comprenden un anticuerpo desvelado en los aspectos de anticuerpo anteriormente. El anticuerpo 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 se incluye dentro del alcance de los anticuerpos que pueden estar presentes en las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación.

La divulgación proporciona además un método de modular la actividad de células que expresan TLR3 en un paciente en necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición según la divulgación. En un aspecto, la actividad de células que expresan TLR3 se inhibe, en el que el paciente tiene una enfermedad o trastorno en el que tal inhibición puede promover, potenciar y/o inducir un efecto terapéutico (o promueve, potencia y/o induce un efecto tal en al menos una proporción sustancial de pacientes con la enfermedad o trastorno y características sustancialmente similares a las del paciente, como puede determinarse por, por ejemplo, ensayos clínicos).

En otros aspectos, el método puede comprender la etapa adicional de administrar a dicho paciente un agente terapéutico adicional apropiado útil en tratamiento o prevención de la enfermedad que padece el paciente o a la que es susceptible; ejemplos de tales agentes incluyen un agente inmunomodulador, un agente hormonal, un fármaco antiinflamación, un esteroide, un supresor del sistema inmunitario, un corticosteroide, un antibiótico, un antiviral o un compuesto auxiliar. Tales agentes adicionales pueden administrarse a un paciente como una forma de dosificación única junto con dicho anticuerpo, o como una forma de dosificación separada. La dosificación del anticuerpo (o anticuerpo y la dosificación del agente terapéutico adicional conjuntamente) son suficientes para inducir, promover y/o potenciar detectablemente una respuesta terapéutica en el paciente. Si se administra por separado, el anticuerpo, fragmento o derivado y el agente terapéutico adicional se administran deseablemente en condiciones (por ejemplo, con respecto al momento exacto, número de dosis, etc.) que producen un beneficio terapéutico combinado detectable al paciente.

Vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias de tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden emplearse en un método de modular, por ejemplo, inhibir, la actividad de células que expresan TLR3 en un paciente. Este método comprende la etapa de poner en contacto dicha composición con dicho paciente. Tal método será útil para tanto la profilaxis como fines terapéuticos.

Para su uso en administración a un paciente, la composición se formulará para administración al paciente. Las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral, parenteralmente, por espray de inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o mediante un depósito implantado. Las usadas en el presente documento incluyen inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Formas inyectables estériles de las composiciones de la presente divulgación pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica usando dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido, son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. También pueden usarse para los fines de formulación otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólida, líquida u otras farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, vehículos comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración por vía oral en una forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen, por ejemplo, lactosa. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con emulsionantes y agentes de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Alternativamente, las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Éstos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura rectal y, por tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden administrarse tópicamente, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por administración tópica, que incluyen enfermedades del ojo, la piel o el tubo digestivo inferior. Formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, las composiciones pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina filante, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

La administración tópica para el tubo digestivo inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan según técnicas muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

Se ha mostrado que varios anticuerpos monoclonales son eficaces en situaciones clínicas, tales como Rituxan Herceptin (Trastuzumab) o Xolair (Omalizumab), y pueden usarse pautas de administración similares (es decir, formulaciones y/o dosis y/o protocolos de administración) con los anticuerpos de la presente divulgación. Programas y dosificaciones para la administración del anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden determinarse según los métodos conocidos para estos productos, por ejemplo, usando las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica de la presente divulgación puede suministrarse a una concentración de 10 mg/ml en tanto 100 mg (10 ml) como 500 mg (50 ml) de viales de un solo uso. El producto se formula para administración IV en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de citrato de sodio

dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. Un intervalo de dosificación adecuado a modo de ejemplo para un anticuerpo en una composición farmacéutica de la presente divulgación puede estar entre aproximadamente 1 mg/m² y 500 mg/m². Sin embargo, se apreciará que estos programas son a modo de ejemplo y que un programa y régimen óptimos pueden adaptarse teniendo en cuenta la afinidad y tolerabilidad del anticuerpo particular en la composición farmacéutica que debe determinarse en ensayos clínicos.

Según otro aspecto, las composiciones de anticuerpo de la presente divulgación pueden comprender además otro agente terapéutico, que incluye agentes normalmente utilizados para el fin terapéutico particular para el que está siendo administrado el anticuerpo. El agente terapéutico adicional estará normalmente presente en la composición en cantidades normalmente usadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular que está tratándose. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes anti-inflamación, esteroides, supresores del sistema inmunitario, antibióticos, antivirales y otros anticuerpos y fragmentos de los mismos.

En otro aspecto, dos o más anticuerpos de la presente divulgación que tienen diferentes reactividades cruzadas, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a distintos epítopes dentro del polipéptido TLR3, se combinan en una única composición de manera que se dirigen a tantos productos génicos de TLR3 distintos como sea posible, por ejemplo, para explicar la diversidad en los polipéptidos dentro de un individuo o en diferentes pacientes, y para hacerlos así tan eficaces como sea posible. Además, una composición de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender múltiples anticuerpos que reconocen un único epítipo de TLR3. Tales combinaciones proporcionarían de nuevo utilidad más amplia en un ámbito terapéutico.

La divulgación también proporciona un método de modulación de la actividad de células que expresan TLR3 en un paciente en necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar una composición según la presente divulgación a dicho paciente. El método se dirige más específicamente a disminuir la actividad de células de TLR3 en pacientes que tienen una enfermedad en la que la reducida actividad de células de TLR3 es beneficiosa (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedad infecciosa, infección viral), o que es causada o se caracteriza por excesiva actividad de células de TLR3.

Enfermedades y afecciones en las que pueden usarse los presentes métodos incluyen todas las enfermedades en las que modular TLR3 puede ser beneficioso, que incluyen, por ejemplo, enfermedades mediadas o agravadas parcial o totalmente por la señalización de TLR3 o por citocinas producidas tras dicha señalización de TLR3. En particular, si se usan anticuerpos que inhiben la señalización de TLR3, tales trastornos incluyen cualquier trastorno mediado o agravado parcial o totalmente por la señalización de TLR3 o por citocinas producidas tras dicha señalización de TLR3, que incluyen, entre otros, trastornos inmunitarios tales como enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Más específicamente, los métodos de la presente divulgación se utilizan para el tratamiento de una variedad de trastornos inmunitarios y otras enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, infecciones (por ejemplo, infección crónica, infección viral) y septicemia. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con los anticuerpos que inhiben la señalización de TLR3 incluyen, pero no se limitan a, artritis, lupus eritematoso sistémico, septicemia, asma, osteoporosis, autoinmunidad a antígenos del sistema nervioso central, diabetes autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino, carditis autoinmune, hepatitis autoinmune.

Otros trastornos inmunitarios tratables usando los anticuerpos que inhiben la señalización de TLR3 según la divulgación incluyen, entre otros, trastornos autoinmunitarios y trastornos inflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn, celiacía, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, encefalomiелitis aguda diseminada (EAD), enfermedad de Addison, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF), anemia aplásica, hepatitis autoinmune, diabetes mellitus, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (SGB), enfermedad de Hashimoto, lupus eritematoso, afecciones desmielinizantes, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome opsoclono-mioclono (SOM), neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, cirrosis, psoriasis, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, anemia hemolítica autoinmune caliente, granulomatosis de Wegener, apendicitis, arteritis, artritis, blefaritis, bronquiolitis, bronquitis, bursitis, cervicitis, colangitis, colecistitis, corioamnionitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dacrioadenitis, dermatitis, dermatomiositis, encefalitis, endocarditis, endometritis, enteritis, enterocolitis, epicondilitis, epididimitis, fasciitis, fibrositis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, hepatitis, hidrosadenitis supurativa, ileítis, iritis, laringitis, mastitis, meningitis, mielitis, miocarditis, miositis, nefritis, onfalitis, ooforitis, orquitis, osteítis, otitis, pancreatitis, parotitis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, flebitis, neumonitis, proctitis, prostatitis, pielonefritis, rinitis, salpingitis, sinusitis, estomatitis, sinovitis, tendonitis, tonsilitis, uveítis, vaginitis, vasculitis y vulvitis.

Los presentes anticuerpos pueden incluirse en kits. Los kits pueden contener opcionalmente adicionalmente cualquier número de anticuerpos y/u otros compuestos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o cualquier otro número de anticuerpos y/o compuestos terapéuticos. Se apreciará que esta descripción del contenido de los kits no es de ningún modo limitante. Por ejemplo, el kit puede contener otros tipos de compuestos terapéuticos. Preferentemente, los kits también incluyen instrucciones para usar los anticuerpos, por ejemplo, que detallan los métodos descritos en el presente documento.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente divulgación se desvelarán en la siguiente sección experimental, que debe considerarse ilustrativa y no limitante del alcance de la presente solicitud.

EJEMPLOS

- 5 Materiales y métodos
- 10 Se compró interferón-alfa (IntronA™) de Schering Plough Corp. *Líneas de células tumorales:* Se compran líneas de células tumorales de melanoma maligno A375 (CRL-1619) de ATCC. *Anticuerpos (antígeno, suministrado, referencia):* Anticuerpo anti-TLR3 pAb, R&D Systems, ref. AF1487. *Instrumentación:* Citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences).
- Inhibición con ARNhc de lentivirus
- 15 Se preparó una construcción de lentivirus y se produjo por Vectalys (Toulouse, Francia), que codifica TLR3 humano de control que se dirige a ARN de horquilla corta (ARNhc). Se infectaron células tumorales con preparación de lentivirus y adicionalmente se seleccionaron con puromicina para conseguir células tumorales shTLR3 A375 estables.
- 20 Resonancia de plasmones superficiales (SPR)
- (a) Métodos T100 generales de Biacore. Se realizaron mediciones de SPR en un aparato T100 de Biacore (Biacore GE Healthcare) a 25 °C. En todos los experimentos de Biacore, tampón HBS-EP+ (Biacore GE Healthcare) o acetato sódico 10 mM a pH 5,6, NaCl 150 mM, 0,05 % de P20 sirvieron de tampón de electroforesis y se analizaron sensogramas con el software Biaevaluation 4.1 y Biacore T100 Evaluation. Se compró TLR3 humano recombinante de R&D Systems.
- 25
- (b) Inmovilización de proteínas. Se inmovilizó proteína TLR3 recombinante covalentemente a grupos carboxilo en la capa de dextrano de un chip Sensor serie 5 de Biacore CM5 (chip). La superficie del chip se activó con EDC/NHS (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 0,2 M, N-hidroxisuccinimida 0,05 M (Biacore GE Healthcare)). Las proteínas se diluyeron a 10 µg/ml en tampón de acoplamiento (acetato sódico 10 mM, pH 5,6) y se inyectaron hasta que se alcanzó el nivel de inmovilización apropiado (es decir, aproximadamente 2000 UR para experimentos de unión y 600 UR para experimentos de afinidad). La desactivación de los grupos activados restantes se realizó usando etanolamina 100 mM a pH 8 (Biacore GE Healthcare).
- 30
- (c) El análisis de unión de anticuerpo se realizó usando HBS-EP+ (pH neutro). Se inyectaron anticuerpos a una concentración de 10 µg/ml durante 2 min a una velocidad de flujo constante de 10 µl/min sobre las proteínas inmovilizadas y se dejó que se dissociaran durante 3 min antes de la regeneración por una inyección de diez segundos de tampón de regeneración NaOH 10 mM, NaCl 500 mM. La corrección del blanco se realizó en línea co-inyectando los anticuerpos solubles sobre la celda de flujo de dextrano de referencia.
- 35
- (d) Ensayo de competición en tampón ácido (pH 5,6). La velocidad de flujo se fijó a 10 µl/min, el primer anticuerpo a una concentración de 50 µg/ml (o poliAU a 100 µg/ml) se inyectó durante 2 min, 3 veces sucesivamente con el fin de saturar la superficie de rhTLR3. Entonces, el segundo anticuerpo se inyectó durante 2 min, también a 50 µg/ml, y se dejó que se dissociara durante 3 min antes de la regeneración por una inyección de 15 segundos de tampón de regeneración NaOH 10 mM, NaCl 500 mM. La corrección del blanco se realizó en línea y se restó la curva usando el anticuerpo de saturación (o ácido nucleico) seguido de una inyección de tampón para eliminar la señal debida a la disociación del primer complejo. La señal resultante se comparó con la obtenida por la inyección del segundo anticuerpo directamente sobre la superficie de rhTLR3.
- 40
- 45
- 50
- Ensayo indicador de luciferasa.
- Se estableció un ensayo de gen indicador usando como promotor ISRE (elemento de respuesta estimulado por IFN) y como indicador gen y proteína luciferasa. Se transfectó establemente una línea celular 293T (ATCC, nº CRL-1573) con el plásmido pISRE-luc (nº 219089 - Stratagene), adicionalmente se seleccionó como respuesta óptima inductora una estimulación con IFN-alfa y se denominó 293T-ISRE de control. Esta línea celular se transfectó adicionalmente establemente con diferentes plásmidos plásmido pUNO-hTLR3 (#puno-htlr3 - InVivogen) y se denominó 293T-TLR3-ISRE. En el día 0, las células se siembran a 4×10^5 células/ml en medio de cultivo completo en placa de cultivo de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Las células se incuban primero a 37 °C durante 20 horas, luego se desechan 50 µl de medio y las células se activan con 100 µl/pocillo finales de cantidades crecientes de poliAU junto con diversas concentraciones de anticuerpos anti-TLR3. Las células incubadas con medio fresco se usarán como actividad de luciferasa de fondo. Las células se incuban a 37 °C durante 6 horas. Se añaden 100 µl de Steady Glo (Promega) recién descongelado a cada pocillo, las placas se incuban 10 min a TA en la oscuridad y la luz emitida en cada pocillo se cuantifica como cuentas por segundo (CPS) en un aparato contador de gamma (TopCount).
- 55
- 60
- 65

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos monoclonales específicos de TLR3

Inmunización nº 1

5 *Cribado primario.* Para obtener anticuerpos anti-TLR3, ratones Balb/c se inmunizaron con una proteína recombinante del dominio extracelular de TLR3 marcado con His humano recombinante (R&D Systems, nº 1487-TR-050). Los ratones recibieron una primo-inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína TLR3 y adyuvante completo de Freund, intraperitonealmente, una 2ª inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína TLR3 y adyuvante incompleto de Freund, intraperitonealmente, y tres refuerzos con 10 µg de proteína TLR3, intravenosamente. Las células del bazo inmunitarias se fusionaron con linfocitos B inmortalizados X63.Ag8.653 y se cultivaron en presencia de células del bazo irradiadas. Se obtuvieron 40 placas de cultivo y se evaluaron en un primer cribado para la unión de TLR3 usando un ELISA desarrollado para la detección de la unión a TLR3. Brevemente, la proteína TLR3 recombinante marcada con His (R&D Systems, nº 1487-TR-050) se recubrió sobre placas de 96 pocillos Ni-NTA (Qiagen). Se siembra el sobrenadante (SN) del cultivo de hibridomas y se incuba en placas de TLR3, y la presencia de la Ig de unión a TLR3 se reveló con cabra F(ab) anti-ratón IgG-HRP. Se seleccionaron sobrenadantes positivos y se probaron para la ausencia de unión a TLR4. Brevemente, la proteína TLR4 rec marcada con His (R&D Systems, nº 3146-TR-050) se recubrió sobre placas de 96 pocillos Ni-NTA (Qiagen). El SN de las placas de cultivo de hibridomas se incubó en placas de TLR4, y la presencia de la Ig de unión a TLR4 se reveló con F(ab) de cabra anti-ratón IgG-HRP. El TLR4 se eligió como un 2º cribado con el fin de discriminar entre pocillos seleccionados en el 1º cribado, en los que se usaron el anticuerpo específico anti-His de anticuerpo específico para TLR3. En segundo lugar, dada la homología entre TLR3 y otros miembros de la familia de TLR, la evaluación inicial demostró que al menos un anticuerpo monoclonal (mAb) comercialmente disponible, indicado sobre su envase como específico para proteína TLR3, aún así reconoció células 293T incorporadas en parafina establemente transfectadas con TLR4.

25 *Cribado secundario; selección de hibridomas de interés.* Se retuvieron 168 sobrenadantes y se probaron en otro cribado en un ensayo de Biacore usando chips de TLR3 rec, seguido de diversos formatos de ensayo basados en la unión a células 293T que expresan TLR3 humano. Se seleccionó adicionalmente la línea celular 293T (ATCC, nº CRL-1573), establemente transfectada con el plásmido pSRE-luc (nº 219089 - Stratagene), como respuesta óptima inductora a estimulación con IFN-alfa y se denominó células 293T de control. Esta línea celular se transfectó establemente adicionalmente con el plásmido pUNO-hTLR3 (nº puno-htlr3 - InVivogen), o el plásmido pUNO-hTLR4 (nº puno-tlr4 - InVivogen) y se denominaron respectivamente 293T-TLR3 y 293T-TLR4. Se cribaron los sobrenadantes en un cribado basado en FACS para unirse a células 293T-TLR3 sin unión a células de control 293T, y en paralelo en un cribado de IHC para unirse a células 293T-TLR3 como sedimento de células congelado, sin unión a células 293T-TLR4. Los pocillos seleccionados en el cribado de IHC para unirse a células 293T-TLR3 como sedimento congelado de células también se probaron adicionalmente en un cribado de IHC para unirse a células 293T-TLR3 como sedimento de células incorporadas en parafina. Brevemente, para el cribado de FACS, la presencia de anticuerpos de reacción en sobrenadantes se reveló por anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (pAb) marcado con biotina, estreptavidina marcada con PE. Para el cribado de IHC, la presencia de anticuerpos de reacción (Ab) en sobrenadantes se reveló por pAb de burro anti-ratón marcado con biotina (nº 715-065-150, Jackson Immunoresearch Laboratories), estreptavidina marcada con peroxidasa (nº E2886, SIGMA) y se reveló con DAB (nº SK-4105, Vector Laboratories).

45 *Clonación de hibridomas de posible interés.* 42 hibridomas posiblemente interesantes seleccionados del cribado inicial se clonaron por técnicas de dilución limitante en placas de 96 pocillos, y se probaron 304 subclones en una serie de cribados del siguiente modo. Los 304 subclones se evaluaron primero en un cribado para la unión de TLR3 usando el mismo ELISA desarrollado para la detección de la unión a TLR3, y se seleccionaron sobrenadantes positivos y se probaron para la ausencia de unión a TLR4 en ensayo de ELISA, dando 228 clones que fueron selectivos para TLR3. Todos los sobrenadantes que dan una relación por encima de 10 para la DO obtenida en el ELISA de TLR3 a la DO obtenida en el ELISA de TLR4 se seleccionaron como específicos para TLR3. Entre ellos estuvieron sobrenadantes del pocillo C3 de la placa 31 (31C3), pocillo H3 de la placa 29 (29H3), pocillo E7 de la placa 23 (23E7), pocillo C8 de la placa 23 (23C8) y pocillo F11 de la placa 28 (28F11). 31C3, 29H3, 23C8 y 28F11 son de isotipo IgG1.

55 De entre los 304 clones, 63 clones, seleccionados por proceder de preclones que dieron positivo en IHC congelada, también se probaron en un cribado de IHC congelada para unirse a células 293T-TLR3 como sedimento de células congeladas, sin unión a células 293T-TLR4, dando 31 clones positivos en IHC congelado.

60 De entre los 71 clones positivos en tinción de FACS y los 31 clones positivos en IHC congelado, se seleccionaron 41 clones para criopreservación de los 304 clones iniciales.

Inmunización nº 2

65 *Cribado primario.* Se llevó a cabo otra serie de inmunización con el fin de generar diferentes anticuerpos. Usando un sistema experimental similar al de la primera serie de inmunización, se inmunizaron ratones Balb/c, se fusionaron células del bazo inmunitarias y se cultivaron en presencia de células del bazo irradiadas. Se obtuvieron placas de

cultivo y se evaluaron en un primer cribado para la unión de TLR3 usando un ELISA desarrollado para la detección de la unión a TLR3. Se seleccionaron 263 clones de los 2840 para el cribado secundario.

- 5 *Cribado secundario; selección de hibridomas de interés.* Se retuvieron 263 sobrenadantes y se probaron en otro cribado en un ensayo de inhibición sobre células 293T-TLR3. Se seleccionaron clones que tuvieron un efecto inhibitor superior al 95 %. Entre ellos estuvieron los sobrenadantes del pocillo A3 de la placa 34 (34A3).

Ejemplo 2 - Modulación de TLR3

- 10 Se obtuvieron CD mieloides (CDM_d) de CMSP aislando CMSP de donantes humanos sanos normales. Se purificaron monocitos de CMSP usando selección positiva con microperlas CD14 humanas (Miltenyi Biotech) siguiendo las instrucciones generales. Adicionalmente se derivaron monocitos en CD (CDM_d) por incubación de 5-6 días en GM-CSF humano (Leucomax, SP) e IL-4 humana (R&D Systems) a respectivamente 200 ng/ml y 20 ng/ml.

- 15 Entonces, las CDM_d resultantes se sembraron a 10⁶ células/ml, por duplicado, en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células se activaron durante 20 horas en un volumen final de 200 µl, junto con los anticuerpos anti-TLR3 a las concentraciones indicadas. Se añadieron cantidades crecientes de poliAU (30, 100, 300 y 900 µg/ml) a los pocillos para obtener una lectura de dosis-efecto.

- 20 Los sobrenadantes se recogieron después de 20 h de estimulación, se congelaron a -20 °C y adicionalmente se ensayaron para IL-6 y IP-10 usando enzimoimmunoanálisis de adsorción. A continuación, las células se recogieron, se tiñeron para marcadores de activación CD86 (con a.huCD86 ratón, IgG1, FITC, BD Biosciences, ref 555657), con detección usando citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences).

- 25 Las Figuras 1 y 2 ilustran las propiedades inhibitoras de los anticuerpos 31C3 y 29H3 (ambos son del isotipo IgG1) en términos de activación celular de CD86 e IL-6, secreción de IP-10. Los anticuerpos anti-TLR3 31C3.1 y 29H3.7 antagonizan, *in vitro*, la activación de CD mieloides mediada por TLR3, además, estos anticuerpos regularon eficazmente por disminución la expresión de CD83/CD86 mediada por TLR3 y anularon la secreción de citocinas/quimiocinas mediada por TLR3, en particular IP-10 y IL-6.

- 30 Se generaron fragmentos F(ab)₂ a partir de los anticuerpos 31C3.1 y 29H3.7 por escisión con papaína y purificación por cromatografía de intercambio iónico sobre MonoQ 5/50 GL, se analizaron por SDS-PAGE y se probaron para la inhibición en términos de activación celular de CD86 y secreción de citocinas. Los fragmentos F(ab)₂ de ambos anticuerpos 31C3.1 y 29H3.7 regularon eficazmente por disminución la expresión de CD83/CD86 mediada por TLR3 y anularon la secreción de citocinas/quimiocinas mediada por TLR3, a un grado similar a los anticuerpos de longitud completa. La Figura 3 muestra los resultados para el anticuerpo 31C3, en el que fragmentos F(ab)₂ de anticuerpo 31C3 e IgG 31C3 completa anulan la expresión de CD86 mediada por TLR3 y la secreción de IP-10 a un grado similar; la Figura 4 muestra lo mismo para fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo 29H3.

- 40 En un experimento similar se evaluaron la capacidad de anticuerpos 28F11 y 23C8 para inhibir la señalización de TLR3, en comparación con el anticuerpo 31C3. Los anticuerpos se probaron a una concentración de 50 µg/ml en presencia de una dosis creciente de poliAU. Los resultados se representan en las Figuras 14A y 14B, subrayando las propiedades inhibitoras de los anticuerpos según la divulgación.

- 45 El anticuerpo 34A3 también se ha probado de un sistema similar. Esta vez, las células (CDM_d) se estimulan con una dosis fija de poliAU (300 µg/ml) y se añaden dosis crecientes del anticuerpo al medio. Las Figuras 19A y 19B ilustran los resultados para el anticuerpo 34A3, en comparación con 31C3 en términos de IL-6 y secreción de IP-10.

Ejemplo 3 - Afinidad bivalente

- 50 Se compararon las propiedades de unión de los anticuerpos 29H3.7, 23E7.3, 31C3.1 y los anticuerpos comercialmente disponibles TLR3.7 (eBiosciences) y 40C1285 (Abcam) usando los métodos descritos para SPR, punto c). La Figura 5 muestra que la afinidad de unión por TLR3 es significativamente mejor en el caso de 29H3.7 y 31C3.1 que en el caso de anticuerpos comercialmente disponibles.

- 55 La unión a TLR3 se determinó a condiciones neutras (pH 7,2) y ácidas (pH 5,6), y se calcularon valores de K_D. Los resultados (media de 2 o 3 experimentos) se muestran en la Tabla 1. A pH neutro, 23E7, 29H3.7 y 31C3.1 mostraron todos una afinidad bivalente (K_D) fuerte y similar por TLR3 humano recombinante mejor que 100 picomolar (aproximadamente 50 picomolar). El anticuerpo TLR3.7 (eBiosciences) en comparación mostró una afinidad de unión significativamente menor. A pH ácido, sin embargo, 23E7 perdió afinidad de unión considerable y su K_D fue a aproximadamente 4 nanomolar. Se midieron la afinidad de 31C3, 23C8, 28F11 y 34A3 en las mismas condiciones en un ensayo separado, los resultados se representan en la Tabla 1 y en la Figura 15. Estos resultados indican que los anticuerpos según la invención tienen una alta afinidad, especialmente a pH ácido.

65

Tabla 1

Anticuerpo	K _D media (M) a pH 7,2	K _D media (M) a pH 5,6
23E7,3	3,51 * 10 ⁻¹¹	4,32 * 10 ⁻⁹
29H3.7	4,74 * 10 ⁻¹¹	1,10 * 10 ⁻¹¹
31C3.1	5,05 * 10 ⁻¹¹	6,14 * 10 ⁻¹¹
TLR3.7	4,5 * 10 ⁻⁸	9 * 10 ⁻⁹
23C8	1,38 * 10 ⁻¹⁰	1,03 * 10 ⁻¹¹
28F11	6,50 * 10 ⁻¹⁰	3,35 * 10 ⁻¹⁰
34A3	3,01 * 10 ⁻¹²	5,17 * 10 ⁻¹¹

Ejemplo 4 - Mapeo de epítopes

5 Mapeo de epítopes a pH ácido. Se realizaron ensayos de competición según los métodos descritos para SPR, punto d) a pH 5,6. La Figura 6 ilustra que los anticuerpos 29H3.7 y 31C3.1 fueron capaces de unirse a TLR3 sin competir con poliAU, similarmente, las Figuras 16A y 16B ilustran que los anticuerpos 28F11, 34A3 y 23C8 fueron capaces de unirse a TLR3 sin competir con poliAU. Así, 29H3.7, 31C3.1, 28F11, 34A3 y 23C8 pueden inhibir la señalización de ARNbc sin competir con el epítope de ARNbc sobre TLR3. La Figura 7 ilustra la competición entre los anticuerpos 29H3.7 y 31C3.1. Como la unión a TLR3 por un anticuerpo afecta la unión a TLR3 del otro (aproximadamente el 90 % de inhibición por un anticuerpo del otro), puede llegarse a la conclusión de que estos dos anticuerpos compiten por un epítope similar sobre TLR3. Similarmente, las Figuras 15A y 15B ilustran la competición entre el anticuerpo 31C3 con los anticuerpos TLR307, 23C3, 28F11 y 29H3. La Figura 15A ilustra la unión en ausencia de cualquier anticuerpo de competición mientras que la Figura 15B ilustra el nivel de unión después de la saturación del chip de hTLR3 con 31C3. La pérdida en el nivel de unión refleja el impedimento producido por el anticuerpo 31C3, y subraya la competición por la unión entre los anticuerpos probados. El nivel de unión de TLR3.7 que no está afectado por la competición de 31C3 subraya que los anticuerpos compiten por epítopes diferentes, mientras que la disminución en el nivel de unión por todos los otros anticuerpos subraya que todos compiten con 31C3 por un epítope similar.

20 Mapeo de epítopes a pH neutro. Se realizaron ensayos de competición según los métodos descritos para SPR, a pH 7,2. Los anticuerpos 29H3.7 y 31C3.1 compitieron entre sí para unirse a TLR3 ya que la unión por un anticuerpo afectó la unión a TLR3 del otro. También se exploró el mapeo de epítopes con el anticuerpo comercial TLR3.7 y el anticuerpo 23E7.3. Ninguno de estos anticuerpos compitió para unirse a TLR3 con ninguno de los anticuerpos 29H3.7 y 31C3. Sin embargo, el anticuerpo TLR3.7 compitió para unirse a TLR3 con el anticuerpo 23E7.3, que indica que tienen sitios de unión que se solapan.

30 Se midió la afinidad de unión del anticuerpo 34A3 tanto solo sobre un chip de rhTLR3 como en condiciones en las que el chip de rhTLR3 se saturó con el anticuerpo 31C3 antes de la adición de 34A3. Los resultados se muestran en la Figura 17, y proporcionan evidencia de que los dos anticuerpos compiten para unirse a hTLR3, compartiendo así un determinante epitópico común en vista de sus sitios de unión que se solapan.

La Figura 8 muestra mapas de superficie molecular de los dominios extracelulares de la proteína TLR3 humana, generados por modelado informático usando SwissPdb Viewer 4.0 (Guex y Peitsch (2007) Electrophoresis 18: 2714-2723) basados en datos públicamente disponibles como el archivo de datos 1ZIW de la base de datos Resource for Studying Biological Macromolecules del proyecto Protein Data Bank (PDB) del Instituto Europeo de Bioinformática (Hinxton R.U.). El extremo C está a la izquierda y el extremo N a la derecha en esta vista, que muestra la cara de TLR3 que está sustancialmente libre de glucosilación, estando la otra cara ampliamente oculta por hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Choe et al. (2005) Science 309:581-585). El mapa de superficie al lado derecho en la Figura 8 muestra el potencial electrostático del polipéptido TLR3 humano a pH neutro, delimitado con la superficie molecular. Las áreas principales del potencial electrostático positivo se indican con flechas, formando una región general de potencial positivo y neutro sobre la cara libre de glucosilación del lado del extremo C. Se cree que la cara libre de glucosilación está accesible para la interacción con moléculas accesorias de ligandos o monómeros de TLR3 u otros ensamblajes de oligómeros, y se cree que la región de potencial electrostático positivo sobre el lado del extremo C (en el sombreado más oscuro, las áreas positivas principales indicadas por flechas) se corresponde con la región de unión de ARNbc. Estas regiones también se muestran en la Figura 5 de Choe et al. (2005). El mapa en el lado izquierdo indica residuos de aminoácidos determinados por estudios de mutación que van a participar en la unión de ARNbc, en los que se inhibió la unión de ARNbc por residuos (>80 %) por mutación de los residuos H539, N541, N466, R489, N517 o N540, y en los que se inhibió la unión de ARNbc (>80 %) por mutación de los residuos K117, K137 y K139. El modelo propuesto en Choe et al. (2005) es que TLR3 forma un homodímero en el que la interfase de dimerización es próxima a la región del extremo C sobre la cara libre de glucosilación y que ARNbc se une a solo la cara libre de glucosilación de TLR3, de forma que dos monómeros de TLR3 podrían emparejar ARNbc en un complejo de dos monómeros de TLR3 y una hebra de ARNbc. También se ha propuesto un modelo que implica un complejo de TLR3 oligomérico formado por múltiples dímeros de TLR3 que se unen a hebras de ARNbc más largas (véase, por ejemplo, Bell et al. (2006) PNAS USA 103(23): 8792-8797). Ranjith-Kumar et al. (2007) J. Biol. Chem. 282(10): 7668-7677 proponen que TLR3 puede existir en una etapa oligomerizada en ausencia de ligando, y que la unión de ARNbc puede producir reordenamiento en el dímero que conduce al deslizamiento lateral de los monómeros el uno hacia el otro y ajuste para acomodar el ARNbc, y en el que el cambio

de conformación resultante puede estimular la interacción del dominio de TIR para inducir la señalización. Por tanto, una explicación podría ser que los anticuerpos anti-TLR3 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 y 34A3 se unen a TLR3, por ejemplo, sobre la cara libre de glucosilación, y posiblemente en un epítipo que tiene una carga negativa a pH neutro que, por tanto, no está en la región de la unión de ARNbc a TLR3. Por tanto, los anticuerpos no prevendrían la interacción del ARNbc con TLR3, pero podrían inhibir la señalización, por ejemplo, previniendo que un dímero u oligómero de TLR3 que tiene ARNbc unido se reordene o adopte la configuración requerida para provocar la interacción de los dominios de TIR, o interfiriendo con la formación apropiada de dímeros de TLR3 y/o un complejo ternario de TLR3-ARNbc consiguiente.

10 Ejemplo 5 - Ensayo indicador

Los anticuerpos se probaron para la inhibición de la señalización de TLR3 en una actividad de gen indicador basado en luciferasa (293T-TLR3-ISRE). Se ha informado que la interacción del receptor TLR3 usando agonistas de TLR3 tales como poli (I:C) activa la vía de IFN tipo que incluye un promotor ISRE (Wietek et al. J. Biol. Chem., 278(51), p50923, 2003). Brevemente, se usaron agonistas de TLR3 de ARNbc para inducir la señalización de TLR3 en el ensayo indicador en presencia de anticuerpo anti-TLR3 31C3 y se evaluó la señalización de TLR3. Los resultados, mostrados en la Figura 9, muestran que el anticuerpo anti-TLR3 31C3 inhibió fuertemente la señalización de TLR3 en un modo dependiente de la dosis, en comparación con un anticuerpo anti-TLR3 de control que previamente se había determinado que no tenía efecto sobre la señalización de TLR3.

En otro conjunto de experimentos, se incubaron células 293-huTLR3 con diferentes concentraciones de los mAb anti-TLR3 durante 24 horas (véase la Figura 10A; la concentración de mAb se representa en el eje en $\mu\text{g/ml}$ a escala logarítmica), seguido de la adición al medio del agonista de TLR3 poliAU a una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$. Se midió la expresión de luciferasa después de 24 h. Los resultados se representan en la Figura 10A, y las CI50 se representan en la Tabla 2 a continuación, que indican que los anticuerpos según la invención tienen excelentes propiedades de inhibición.

Tabla 2

	CI50 ($\mu\text{g/ml}$)
31C3	2,25
23C8	1,83
28F11	5,56

En otro conjunto de experimentos, se llevó a cabo la misma prueba de inhibición con 100 $\mu\text{g/ml}$ de poliAU y los anticuerpos de prueba 31C3, 23E8 y 34A3. Se calcularon los valores de CI50 y todos los anticuerpos tuvieron una CI50 inferior a 5 $\mu\text{g/ml}$. Además, 34A3 presentó un efecto de inhibición potenciado a bajas concentraciones (Figura 10B). Las Figuras 10A y 10B muestran las propiedades de inhibición de dosis crecientes de los anticuerpos según la invención, la inhibición de la señalización de TLR3 es dependiente de la dosis. Este ensayo confirma las excelentes propiedades de inhibición de los anticuerpos según la invención.

En otra prueba, se evaluaron las propiedades de inhibición de los anticuerpos según la invención en una situación inflamatoria, aquí en presencia de IFN α . Brevemente, se probaron tres condiciones diferentes. En la condición 1 (Figura 11A) se evaluó la secreción de IP-10 sin ningún pre-tratamiento; en la condición 2 (Figura 11B) se evaluó la secreción de IP-10 después de un pre-tratamiento de 24 horas con IFN α (1000 UI/ml); en la condición 3 (Figura 11C) se evaluó la secreción de IP-10 después de un pre-tratamiento de 24 horas con poliAU (300 $\mu\text{g/ml}$), a continuación un intervalo de dosis de ARNbc (poliC para las Figuras 11A y 11B, poliAU para la Figura 11C) y se añadió el anticuerpo anti-TLR3, tanto 31C3 como 23C8, a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, se cuantificó (en $\mu\text{g/ml}$) la secreción de IP-10 después de 24 horas, usando ELISA.

Los resultados, representados en la Figura 11, resaltan que los anticuerpos según la invención siguen siendo buenos inhibidores de TLR3 incluso en presencia de moléculas estimulantes, tanto ARNbc como citocinas inflamatorias. Tales condiciones imitan enfermedades inflamatorias pre-establecidas.

50 Ejemplo 6 - Tinción con FACS

Brevemente, se recogen líneas celulares 293T o 293T-ISRE/TLR3, el medio se lavó, y las células se fijaron y permeabilizaron usando un reactivo de permeabilización IntraPrep™ de Beckman Coulter, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las células permeabilizadas se incubaron a TA durante 20 min con 25 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 31C3, adicionalmente se revelaron por un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC. Las gráficas se representan en la Figura 13. La Figura 13A representa el control negativo sobre la línea celular HEK293T. La Figura 13B representa la tinción obtenida sobre células HEK293T-TLR3. No se tiñeron las células incubadas con anticuerpo de isotipo de control, en lugar de anticuerpo 31C3 anti-TLR3.

La tinción obtenida usando el anticuerpo 31C3 en células permeabilizadas indica que los anticuerpos reconocen y se unen específicamente a TLR3 humano intracelular en células.

Ejemplo 7 - Estudios cinéticos

Se realizó otro conjunto de ensayos para determinar la cinética de inhibición de los anticuerpos según la invención. Brevemente, se incubaron CDMd con un anticuerpo anti-TLR3 (31C3 o 23C8, a una concentración de 50 µg/ml) y un intervalo de dosis de poliAU en diversos marcos de tiempo. Entonces, el medio se incubó durante 24 horas y se midió la secreción de IP-10 por ELISA. La Figura 12A representa la secreción de IP-10 en ng/ml (dependiendo de la dosis de poliAU) para el anticuerpo 31C3; la Figura 12B representa los resultados para el anticuerpo 23C8.

Pre-estim: El anticuerpo anti-TLR3 se incubó 1 h 30 antes de la adición de ARNbc.

Co-estim: El anticuerpo anti-TLR3 y el ARNbc se añadieron simultáneamente.

Post-estim: El ARNbc se incubó 1 h 30 antes de la adición del anticuerpo anti-TLR3

Estos resultados subrayan que los anticuerpos según la invención son eficaces para la inhibición de TLR3 independientemente del estado de unión del ARNbc a la proteína TLR3. Los anticuerpos no compiten con el sitio de unión de ARNbc, pero todavía pueden inhibir la señalización de TLR3, incluso cuando ARNbc ya está unido a la proteína TLR3.

Ejemplo 8 - Ensayos de internalización de TLR3

Brevemente, tanto ningún anticuerpo como 50 µg/ml del anticuerpo anti-TLR3 31C3 se incubó con líneas celulares 293T-ISRE/TLR3 vivas, durante 2 h o 24 h a 37 °C. A continuación, las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron usando reactivo de permeabilización IntraPrep de Beckman Coulter. La presencia de Ab anti-TLR3 31C3 unido a TLR3 se revela con un Ab de cabra anti-ratón, marcado con APC. Alternativamente, se incubaron células permeabilizadas con tanto isotipo de control como con un mAb específico de TLR3 eficaz en FACS, no compitiendo con el Ab 31C3 por la unión a TLR3, ambos marcado con biotina, y adicionalmente se revelaron mediante incubación de células con derivado de estreptavidina fluorescente. Las gráficas se representan en la Figura 12. La Figura 12A representa el control negativo, que representa la intensidad de fluorescencia de las células 293T-ISRE/TLR3 en ausencia de un anticuerpo que se enlaza a las proteínas TLR3. La Figura 12C y D representan la fluorescencia inducida por la unión a la proteína TLR3 del anticuerpo 31C3 internalizado, después de 24 h o 2 h de incubación, respectivamente. La Figura 12B indica el nivel en estado estacionario de la expresión de TLR3 en líneas celulares 293T-ISRE/TLR3, sin pre-incubación con anticuerpo 31C3. La Figura 12D y 12F, que muestra una fluorescencia similar a la Figura 12B, confirman que la unión de TLR3 por anticuerpo 31C3 no modula por disminución la expresión de TLR3 sobre las líneas celulares 293T-ISRE/TLR3.

Aquellos resultados muestran que los anticuerpos según la invención son rápida y eficazmente internalizados, además sin ninguna modulación por disminución de hTLR3. Estos resultados subrayan la eficiencia de la unión de los anticuerpos según la invención. Además, esta rápida internalización proporciona evidencia de que los anticuerpos son candidatos prometedores para terapia. Tales anticuerpos son también candidatos prometedores para el acoplamiento con un agente tóxico, permitiendo así un direccionamiento específico de células que expresan TLR3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Innate Pharma S.A.

<120> AGENTES DE UNIÓN A TLR3

<130> TLR3-mAbs2

<150> US 61/224,548

<151> 10-07-2009

<160> 85

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 543 095 T3

Met Arg Gln Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Phe Trp Gly Gly Leu Leu Pro
 1 5 10 15

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

Glu Val Ala Asp Cys Ser His Leu Lys Leu Thr Gln Val Pro Asp Asp
 35 40 45

Leu Pro Thr Asn Ile Thr Val Leu Asn Leu Thr His Asn Gln Leu Arg
 50 55 60

Arg Leu Pro Ala Ala Asn Phe Thr Arg Tyr Ser Gln Leu Thr Ser Leu
 65 70 75 80

Asp Val Gly Phe Asn Thr Ile Ser Lys Leu Glu Pro Glu Leu Cys Gln
 85 90 95

Lys Leu Pro Met Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu Ser
 100 105 110

Gln Leu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu Leu
 115 120 125

His Leu Met Ser Asn Ser Ile Gln Lys Ile Lys Asn Asn Pro Phe Val
 130 135 140

Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser
 145 150 155 160

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

ES 2 543 095 T3

Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile Gln Ala Leu Lys Ser Glu Glu Leu Asp
 180 185 190

Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln
 195 200 205

Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
 210 215 220

Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
 225 230 235 240

Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
 245 250 255

Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
 260 265 270

Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
 275 280 285

Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
 290 295 300

Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly
 305 310 315 320

Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln
 325 330 335

Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln
 340 345 350

Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro
 355 360 365

Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu
 370 375 380

Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr
 385 390 395 400

Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys
 405 410 415

Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His
 420 425 430

ES 2 543 095 T3

Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr
 435 440 445

Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser
 450 455 460

Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro
 465 470 475 480

Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
 485 490 495

Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp
 500 505 510

Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525

Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
 530 535 540

Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555 560

Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575

Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590

Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn
 595 600 605

Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620

Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
 625 630 635 640

Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
 645 650 655

Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser
 660 665 670

Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
 675 680 685

Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu Leu

ES 2 543 095 T3

690		695		700
Phe Phe Met Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe Ile Phe Ile Val				
705		710		715
Leu Leu Ile His Phe Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn Val				
		725		730
Ser Val His Arg Val Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Arg Gln Thr Glu				
		740		745
Gln Phe Glu Tyr Ala Ala Tyr Ile Ile His Ala Tyr Lys Asp Lys Asp				
		755		760
Trp Val Trp Glu His Phe Ser Ser Met Glu Lys Glu Asp Gln Ser Leu				
		770		775
Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Phe Glu Leu				
		785		790
Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe Val				
		805		810
Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Lys Arg Phe Lys Val				
		820		825
His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile				
		835		840
Leu Val Phe Leu Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala Leu				
		850		855
Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp Pro				
		865		870
Val Gln Lys Glu Arg Ile Gly Ala Phe Arg His Lys Leu Gln Val Ala				
		885		890
Leu Gly Ser Lys Asn Ser Val His				
		900		

5 <210>2
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)

<400>2

```

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1           5           10           15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Pro Ser Gly Tyr Ser Phe
          35           40           45

Thr Ala Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu
 50           55           60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn
65           70           75           80

Arg Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
          85           90           95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
          115          120          125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
130           135

```

5 <210>3
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221 > SEÑAL
 <222> (1) .. (20)

15 <220>
 <221 > VARIANTE
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa = Phe o Ser

<400> 3

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Xaa Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
 100 105 110

Gly Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5 <210>4
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

10 Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Met
 1 5

15 <210>5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

20 Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser
 1 5 10

25 <210>6
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210>7
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
5
<400>7

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ser Leu
1 5 10

<210>8
<211>7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
10
<400> 8
15

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210>9
<211>9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
20
<400> 9
25

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 10
<211> 134
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
30

<220>
<221 > SEÑAL
35 <222> (1)..(18)

<400> 10

ES 2 543 095 T3

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Cys Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45

Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Leu Gly Asn Lys Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Arg Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser
 130

5 <210> 11
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) .. (20)

<400> 11

Met Asp Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
 20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Arg Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser
 85 90 95

Asn Ile Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
 100 105 110

Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 12

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp His
 1 5 10

10 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 13

Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ile Thr Asn
 1 5

20 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 14

ES 2 543 095 T3

Asp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5

5 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

10 Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ser Val Ala
1 5 10

15 <210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

20 Leu Ala Ser Asn Arg His Thr
1 5

25 <210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

30 Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
1 5

35 <210> 18
<211> 136
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(19)

<400> 18

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

ES 2 543 095 T3

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Asn Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Lys Leu Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 130 135

5 <210> 19
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(20)

<400> 19

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Phe Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
 100 105 110

Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 20

10 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 21

20 Arg Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr
 1 5

25 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 22

30 Ser Thr Lys Leu Gly Tyr Leu Asp Tyr
 1 5

35 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 23

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

40 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 24

45

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1

5

5

<210> 25
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 25

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
 1 5

10

<210> 26
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(19)

20

<400> 26

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Val Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ser Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Asp Gly Gly Asn Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 130 135

5
 <210> 27
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221 > SEÑAL
 <222> (1) .. (20)

10 <400> 27

```

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1           5           10           15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
          20           25           30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
          35           40           45

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50           55           60

Gln Leu Leu Val Tyr Tyr Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
65           70           75           80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
          85           90           95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
          100          105          110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115          120          125
    
```

15
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 28

```

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met His
 1           5           10
    
```

25
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 29

Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser
1 5 10

5 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 30

Asp Asp Gly Gly Asn Tyr Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

10 <210>31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15 <400>31

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

20 <210> 32
 <211>7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 32

Tyr Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

30 <210> 33
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 33

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 34
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 45 <220>
 <221 > SEÑAL
 <222> (1)..(19)
 <400> 34

Met Glu Trp Arg Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Ser Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asn Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
130 135

5 <210> 35
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221 > SEÑAL
 <222> (1) .. (22)

<400> 35

ES 2 543 095 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Met Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110

Thr Gly Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 36

Gly Tyr Val Phe Thr Thr Tyr Ser Ile Tyr
 1 5 10

15 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 37

20 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser
 1 5 10

25 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 38

30 Glu Gly Asn Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

ES 2 543 095 T3

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 39

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Phe
1 5 10

10 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 40

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

20 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 41

Gln Gln Trp Thr Gly Asn Pro Pro Thr
1 5

30 <210> 42
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 42

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgca aggccagtca gaatgttctg actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 240
gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcct 285

35

40 <210> 43
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 43

ES 2 543 095 T3

caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccaaga 120
tcctccccca aacctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc caccc 285

5 <210> 44
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 44

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctacagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttctctga agatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cattatggta ctccct 285

10

<210> 45
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 45
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgt 39

20

<210> 46
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 46

gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctgac ctggtgaaac cttctcagtc actttcactc 60
acctgcactg tcaactggcta ctccatcacc agtgggtata gctggcactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga atggatgggc tacatacact acagtggtag cactaactac 180
aacctatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aaga 294

30

<210> 47
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 47

ES 2 543 095 T3

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctagtgaaga ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggttactaca tgcactgggt caagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggatat attagttgtt acaatggtgc tactagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattt actgtagaca catcctccag cacagcctac 240
 atgcagttca acagcctgac atctgaagac tctgcggtct attactgtgc aaga 294

 <210> 48
 <211> 294
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 48
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gaagcaaagc 120
 catgtaaaga gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acaatggtgc tactagctac 180
 aaccagaatt tcaaggacaa ggccagcttg actgtagata agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc acagcctgac atctgaggac tctgcagctct attactgtgc aagg 294

 <210> 49
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 49
 tactttgact actggggcca aggcaccact ctacagctct cctca 45

 <210> 50
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 50
 attactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca 53

 <210>51
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 51

 atgggatgga gctggatctt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgag 60
 gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaagcctt ctggttactc attcactgcc tactacatgc actgggtgaa gcaaagccat 180
 gtaaagagcc ttgagtggat tggacgtatt aatccttaca atggtgctac tagctacaac 240
 cggaatttca aggacaaggc cagcttgact gtagataagt cctccagcac agcctacatg 300
 gagctccaca gcctgacatc tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag aagtgggggt 360
 aatacgtact ttgactactg gggccaagge accactctca cagtctcc 408
 <210> 52

ES 2 543 095 T3

<211> 381
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 52

atgagtgtgc ccaactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttcttttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatog 240
 aggttcagtg gcagtggtgc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 300
 gaagatyttg ggacttatta ctgtcaacat cattatggta ctctccgac gttcgggtgga 360
 ggcaccaagc tagaaatcaa a 381

10 <210> 53
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 53

atgagagtgc tgattctttt gtgcctgttc acagccttcc ctggtatcct gtctgatgtg 60
 cagcttcagg agtcaggacc tgacctgggtg aaaccttctc agtcactttc actcacctgc 120
 actgtcactg gctactccat caccagtggg tatagctggc actggatccg gcagtttcta 180
 ggaaacaaac tggaatggat gggctacatt cactacagtg gtatcactaa ctacaacca 240
 tctctcagaa gtgcgaatctc tttcactoga gacacatcca agaaccagtt cttcctgcag 300
 ttgaattctg tgactactga ggacacagcc acatattact gtgcaagaga tggttattat 360
 ggtatggact actgggggtca aggaacctca gtcacctctt cc 402

20 <210> 54
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 54

atggactttc agaccaggt ctttgtatc gtgttgcctt ggttgtctgg tgttgatgga 60
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
 atcaectgca aggccagtc gaatgttcgt acttctgtag cctggtatca acagaaacca 180
 gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtcctgat 240
 cgcttcacag gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccgttagcaa tattcaatct 300
 gaggacctgg cagattattt ctgtctgcaa cattggaatt atccgtacac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaaataaa a 381

25 <210> 55

ES 2 543 095 T3

<211> 408
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 55

atgggatgga gctggatctt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgag 60
 gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tactacatac actgggtgaa acaaagccat 180
 gtaaagagcc ttgagtggat tggacgtatt aatccttact atgggtgctac tagctacaac 240
 cagaatttca aggacaagge caacttgact gtagataagt cctccagcac agcctacatg 300
 gagctccaca gtctgacatc tgacgactct gcagctctatt actgtgcaag atcgacccaaa 360
 ctgggggtate ttgactactg gggccaagge accactctca cagtctcc 408

10

<210> 56
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 56

atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct gatctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggtac aggcacacaa tattttctga agatcaacag cctgcagcct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cattatggta ctccggtcac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaaataaa a 381

20

<210> 57
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 57

atgggatgga gctggatctt tctctttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgag 60
 gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacttcatgc actgggtgaa gcaaagccat 180
 gtaaagagcc ttgagtggat tggacgtatt aatccttaca atggegetac tagctacaac 240
 cagaatttca aggacaagge cagcttgact gtagataagt cctccagcac atcctacatg 300
 gaactccaca gectgacatc tgaggactct gcagctctatt actgtgtaag agacgacggg 360
 ggtaactacc cttttgacta ctggggccag ggcaccactc tcacagtctc c 411

ES 2 543 095 T3

<210> 58
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 58

atgagtgatgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctattat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 240
aggttcagtg gcagtggaac aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 300
gaagattttg ggagttacta ctgtcaacat cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 360
gggaccaagc tggaaataaa a 381

10

<210> 59
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 59

atggaatgga gatggatctt tctcttctc ctgtcaggaa ctacaggtgt ccactctgag 60
atccagctgc agcagctctgg acctgagttg gtgaagcctg gggcttcagt gaaggtatcc 120
tgcaaggctt ctggttatgt attcactacc tacagcattt actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagagcc ttgagtgatg tggatatatt gatccttaca atggtgatac tagctacaac 240
cagaagttca agggcaaggc cacattgact gttgacaagt cctccagcac agcctacatg 300
catctcaaca gcctgacatc tgaggactct acagtctatt actgcgcaag agagggcaat 360
tactacggct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc c 411

20

<210> 60
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 60

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataga gtgcctcagt cataatgtcc 60
aggggacaaa ttgttctcac ccagctctcca gcaactcatgt ctgcatctcc aggggagagg 120
gtcaccatga cctgcagtg cagctcaagt gtaagttaca tgttctggta ccagcagaag 180
ccaagatcct cacccaaacc ctggatttat ctcacatcca acctggcttc tggagtcctt 240
gctcgottca gtggcagtg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggactg gtaaccacc cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaaa 384

Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

5 <210> 65
 <211>7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1) .. (4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

15 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 65

20 **Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Xaa**
1 5

25 <210> 66
 <211>7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

35 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (3) .. (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 66

40 **Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**
1 5

45 <210> 67
 <211>7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

50 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

55 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 67

Leu Xaa Ser Asn Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 68

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

5 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

10 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

15 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

20 <400> 68

Gln Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Pro Xaa Thr
1 5

25 <210> 69
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

35 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (4)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

40 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

45 <400> 69

Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

50 <210> 70
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

55 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

60 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (3)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

ES 2 543 095 T3

Gly Tyr Ser Phe Thr Xaa Tyr Tyr Xaa His
1 5 10

5 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

15 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

20 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 74

Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5 10

25 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

35 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

40 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 75

Gly Tyr Ser Xaa Thr Xaa Gly Tyr Xaa Xaa His
1 5 10

50 <210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

55 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

5 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

10 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

<400> 76

Gly Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Tyr Ser Xaa Xaa
1 5 10

15 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

25 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

30 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

35 <400> 77

Arg Ile Asn Pro Tyr Xaa Gly Ala Thr Ser Xaa Asn Xaa Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

40 <210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

50 <400> 78

Arg Ile Asn Pro Tyr Xaa Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 10
 <400> 79

Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Xaa Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp
 15
 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 25
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 30
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 35
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 40
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (13)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 45
 <400> 80

Tyr Ile Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa
 50
 <210>81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 55
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 5 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 10 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 15 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 20 <222> (10)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 25 <222> (13)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <400>81

Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

30 **Xaa**
 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221 > misc_feature
 40 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 45 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <220>
 <221 > misc_feature
 50 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural
 <400> 82

Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 83
 <211> 10
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*
 <220>
 <221 > misc_feature
 5 <222> (1)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <220>
 <221 > misc_feature
 10 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <400> 83
 15

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Asp	Tyr
1				5					10

 <210> 84
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <220>
 <221 > misc_feature
 25 <222> (1)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <400> 84

Xaa	Phe	Asp	Tyr						
1				5					10

 <210> 85
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <220>
 <221 > misc_feature
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <220>
 <221 > misc_feature
 45 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <220>
 <221 > misc_feature
 50 <222> (6)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier amino ácido de origen natural

 <400> 85

Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Tyr
1				5					10

 55

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido TLR3 humano, en el que dicho anticuerpo inhibe la señalización por el polipéptido TLR3 sin bloquear la unión de un ligando de TLR3 ARNbc al polipéptido TLR3, en el que dicho anticuerpo se une específicamente al polipéptido TLR3 bajo condiciones neutras a un pH entre 6,6 y 7,4 y en condiciones ácidas a un pH de entre 4,5 y 6,5 con una K_D sub-nanomolar por su afinidad de unión bivalente;
 5 en el que dicho anticuerpo compite para unirse a un polipéptido TLR3 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 (a) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 34 y 35, y
 (b) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEC ID N° 2 y 3.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une específicamente al polipéptido TLR3 en condiciones ácidas con una K_D 100 picomolar o mejor por su afinidad de unión bivalente.
- 15 3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 (a) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 4, 5 y 6, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 7, 8 y 9, respectivamente; y
 (b) un anticuerpo que tiene (i) las secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 36, 37 y 38, y (ii) las secuencias de aminoácidos de las CDR
 25 1, 2 y 3 de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEC ID N°: 39, 40 y 41, respectivamente.
4. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
- 30 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que el isotipo de dicho anticuerpo es una IgG4.
6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo comprende una región Fc que se modifica para reducir su unión a FcγR.
- 35 7. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂, Fv, diacuerpos, fragmento de anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpos diferentes.
- 40 8. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo está conjugado o covalentemente unido a un resto tóxico.
9. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo puede ser internalizado por una célula que expresa TLR3.
- 45 10. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho anticuerpo está conjugado o covalentemente unido a un resto detectable.
- 50 11. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho anticuerpo se produce por inmunización de un animal no humano con un inmunogén que comprende un polipéptido TLR3.
12. Un hibridoma o célula huésped recombinante que produce el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 14. Una composición farmacéutica de la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, infección, cirrosis y septicemia.
- 60 15. Una composición farmacéutica de la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer.

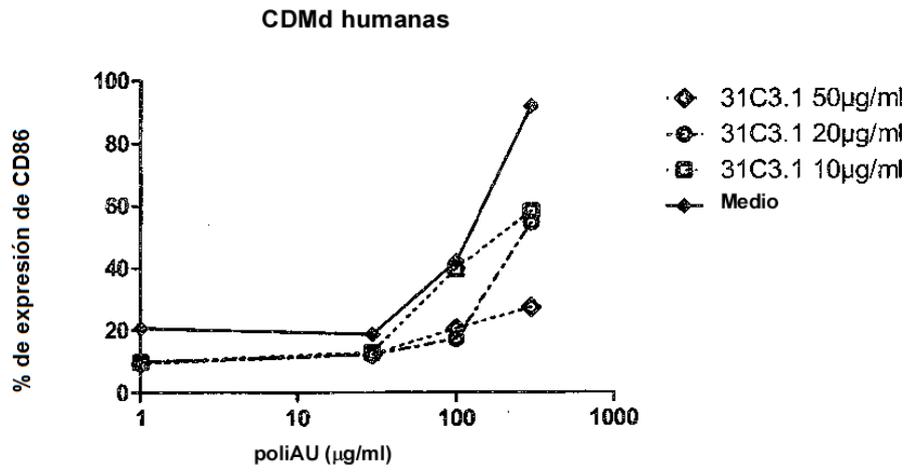


FIG. 1A

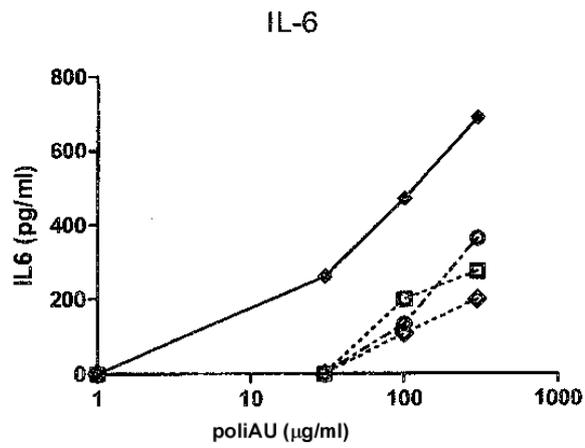


FIG. 1B

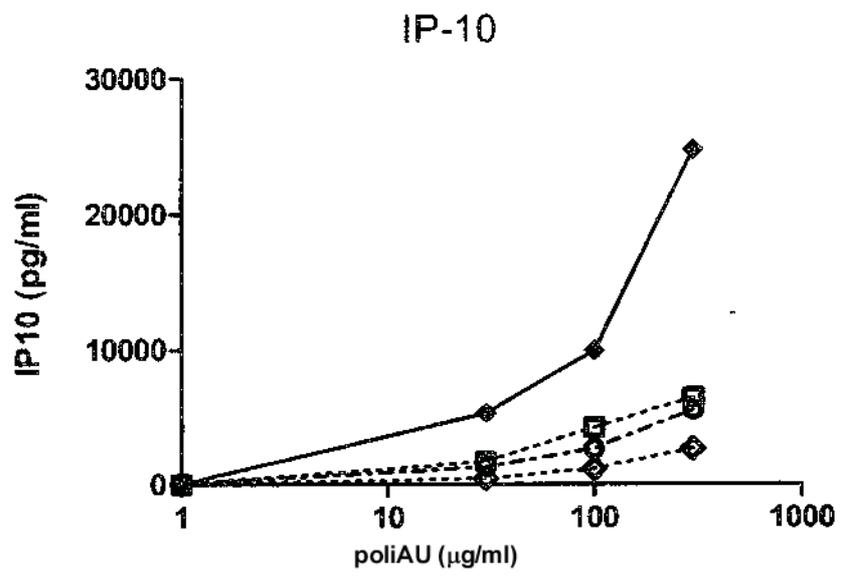


FIG. 1C

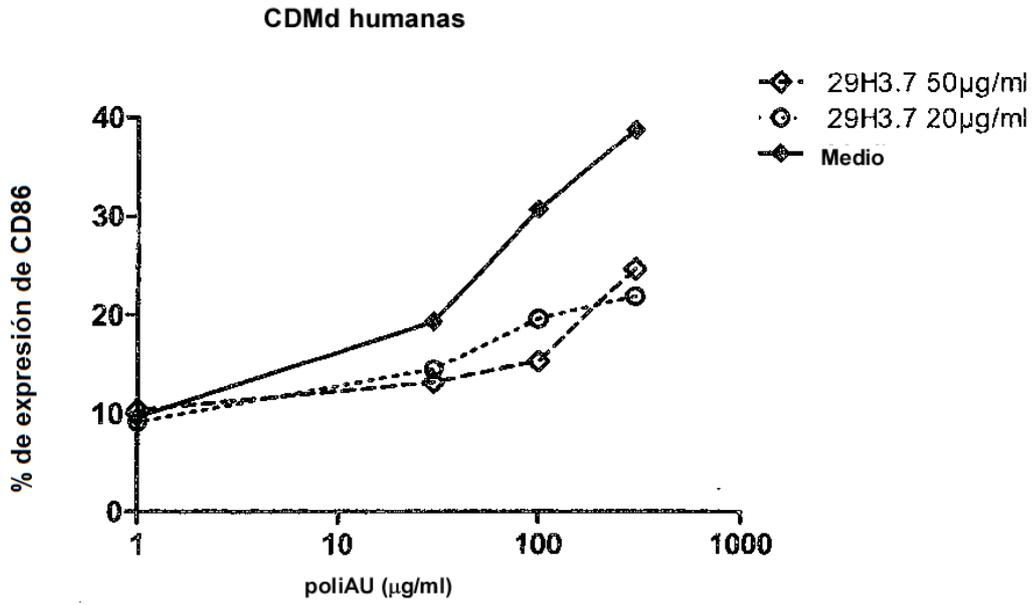


FIG. 2A

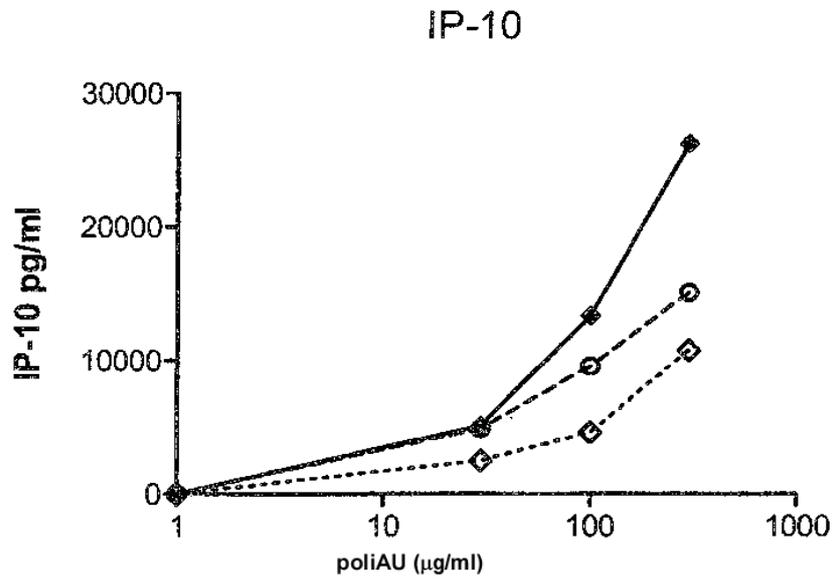


FIG. 2B

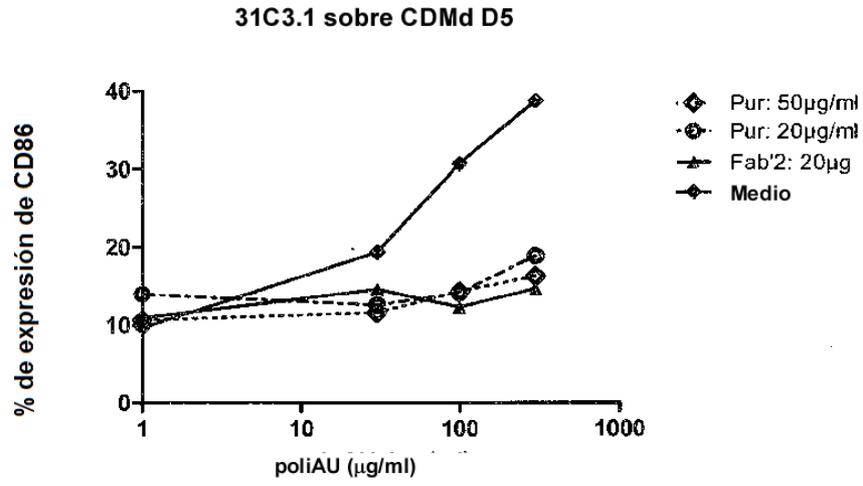


FIG. 3A

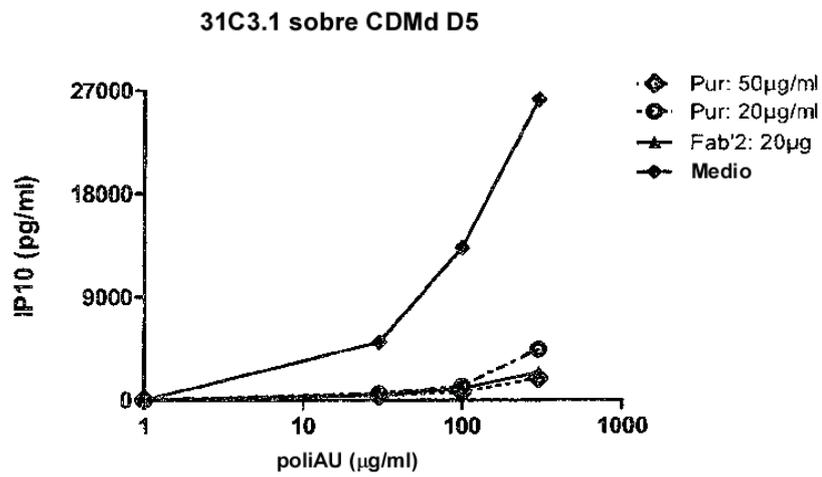


FIG. 3B

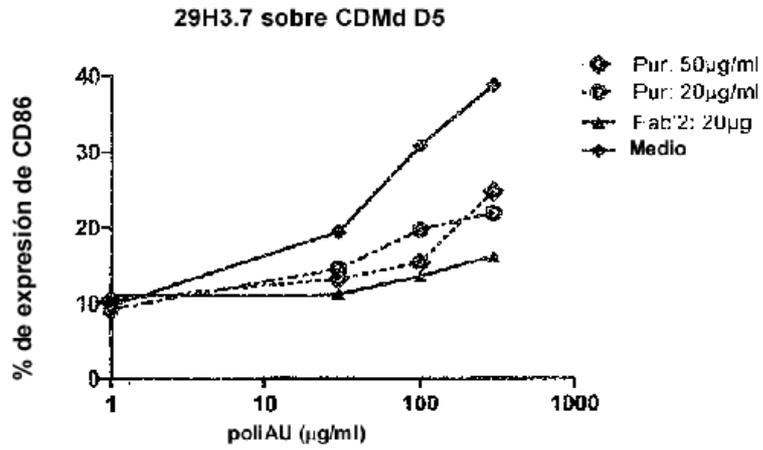


FIG. 4A

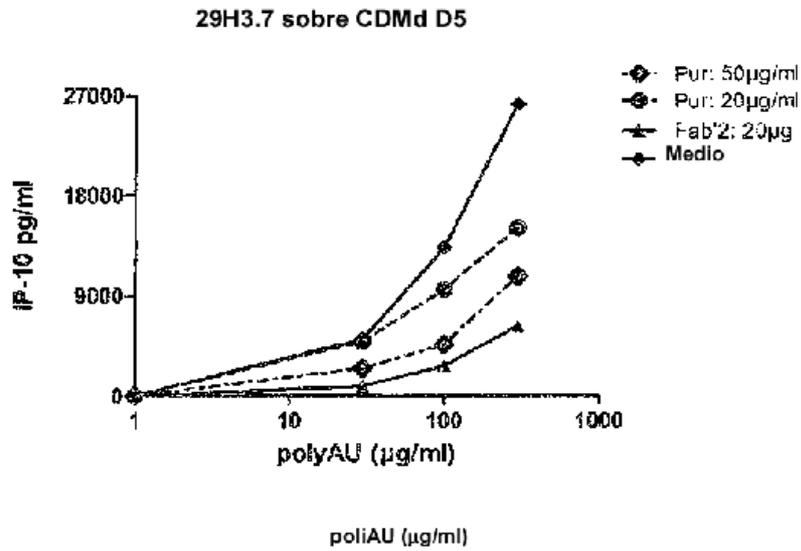


FIG. 4B

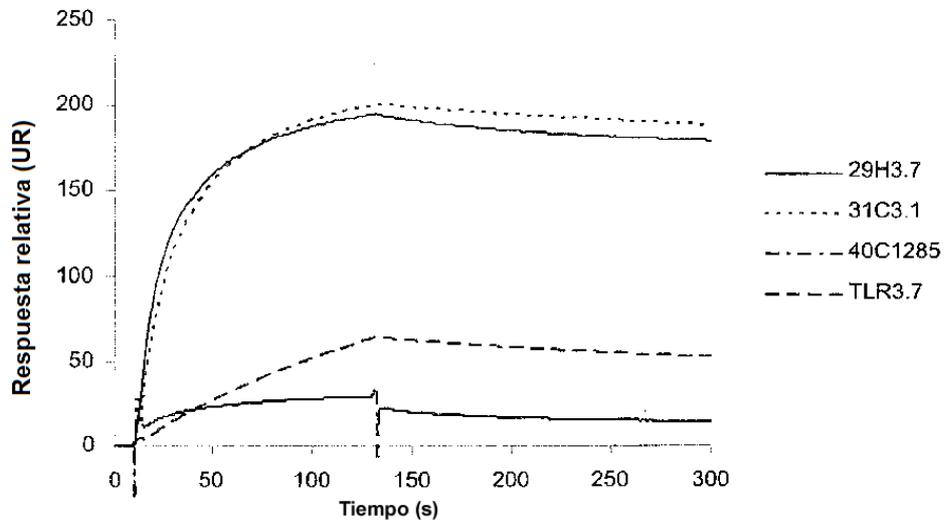


FIG. 5

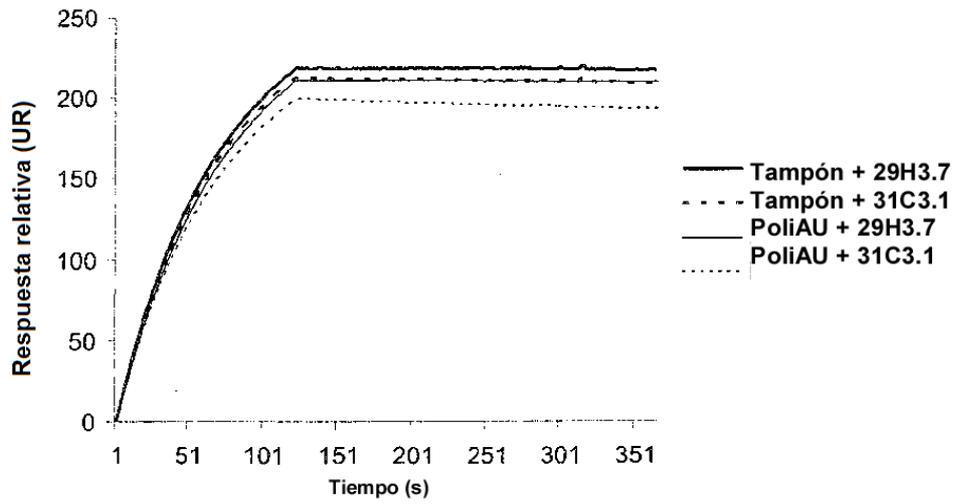


FIG. 6

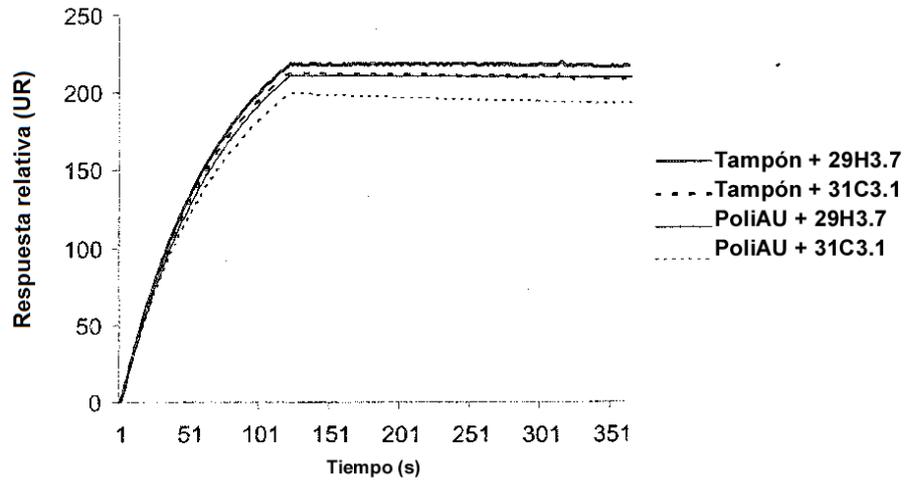


FIG. 7

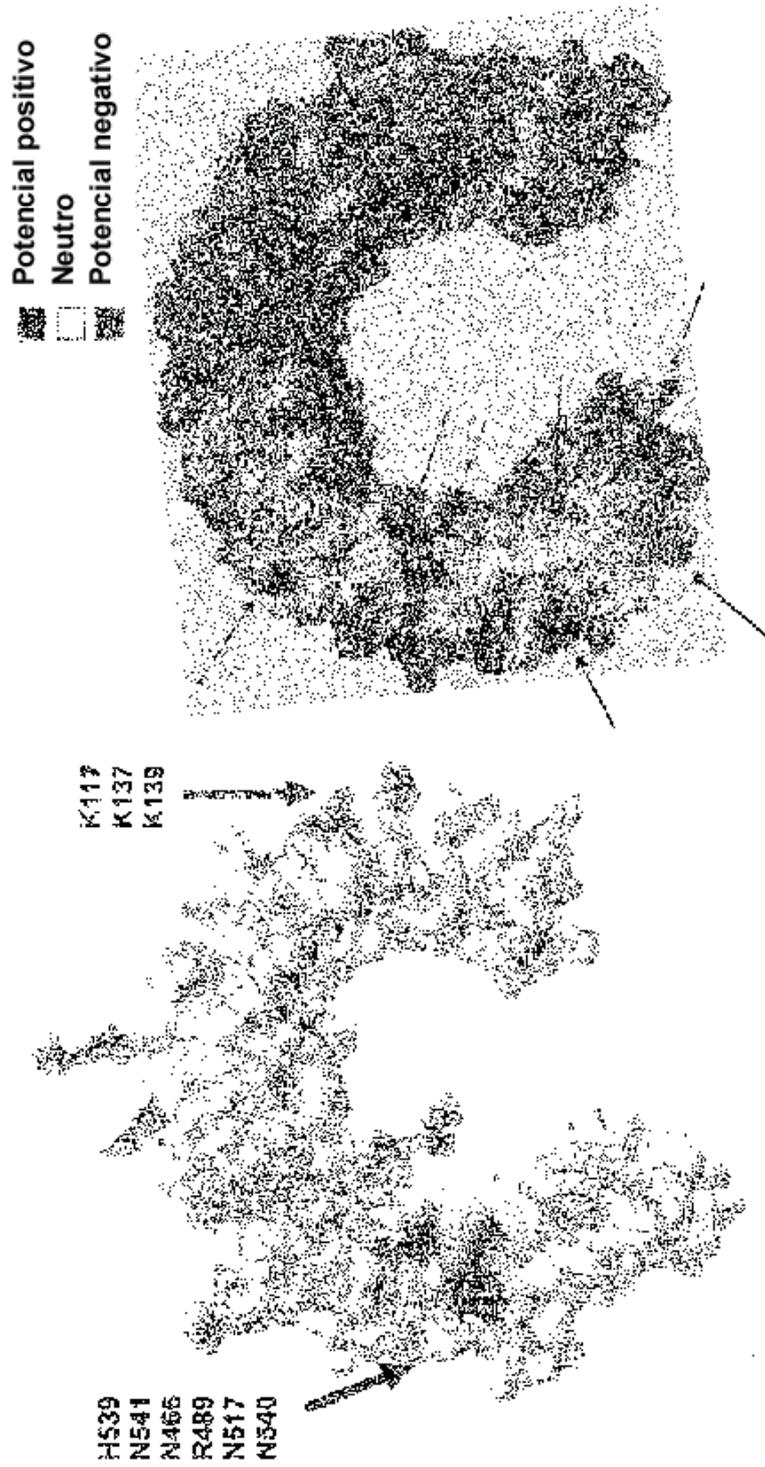


FIG. 8

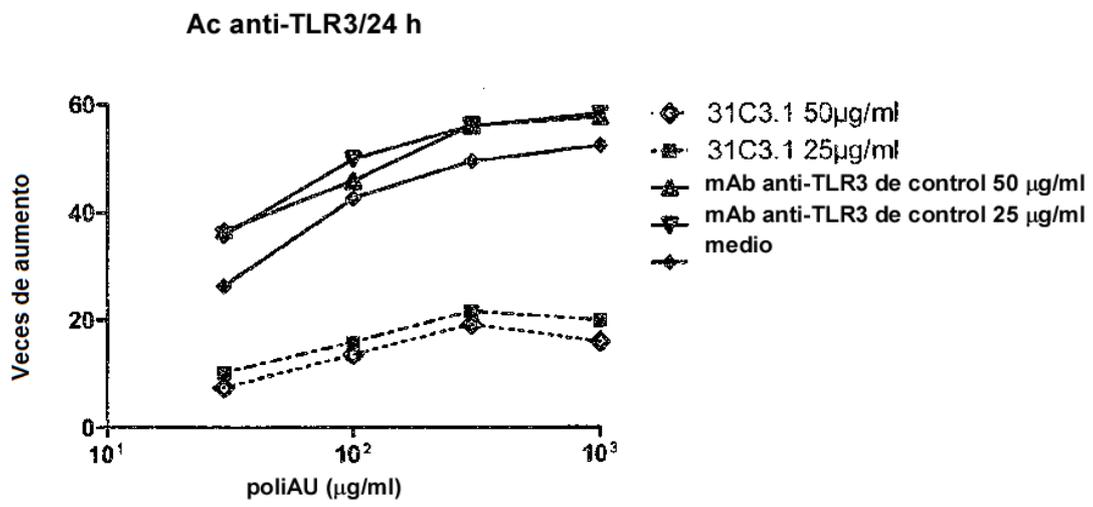


FIG. 9

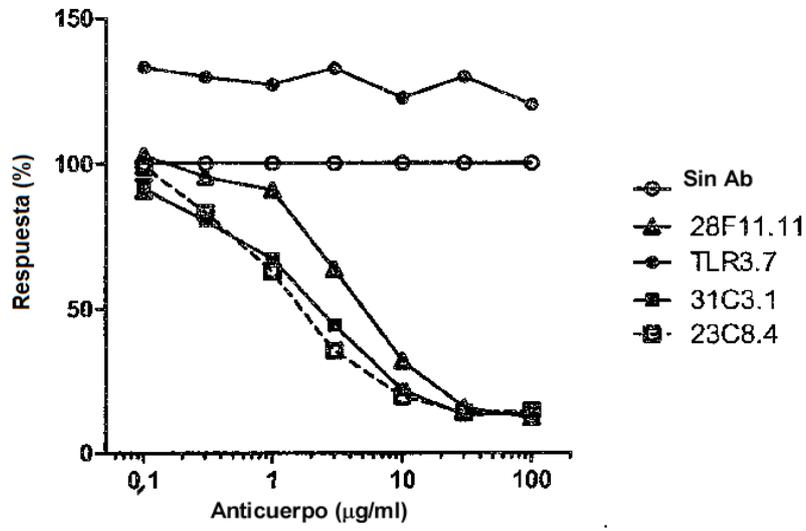


FIG. 10A

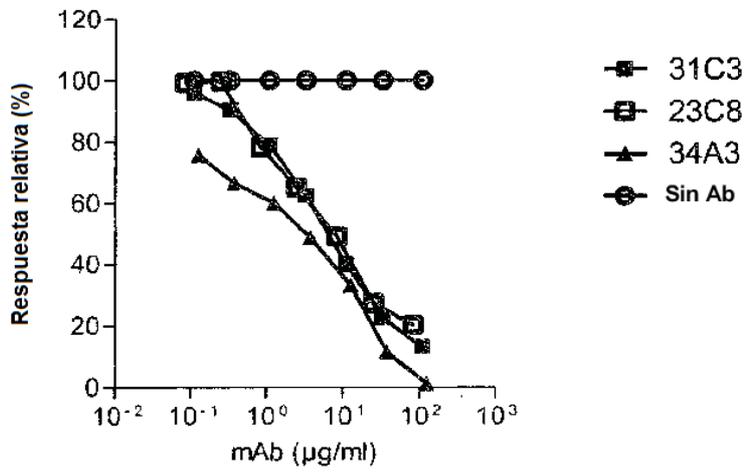


FIG. 10B

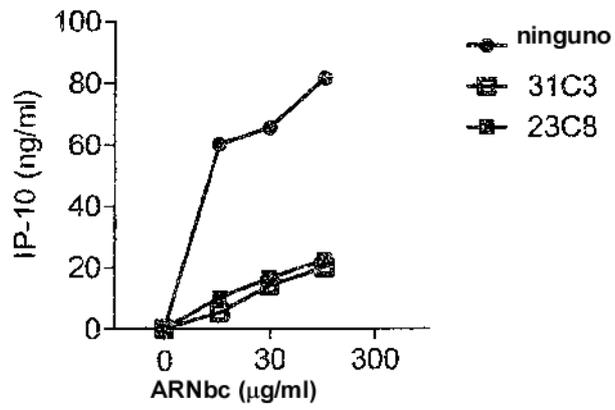


FIG. 11 A

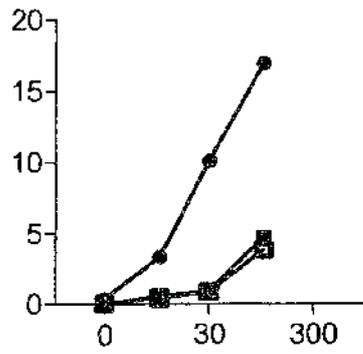


FIG. 11 B

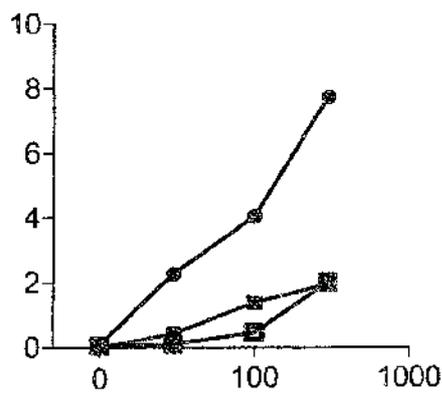


FIG. 11 C

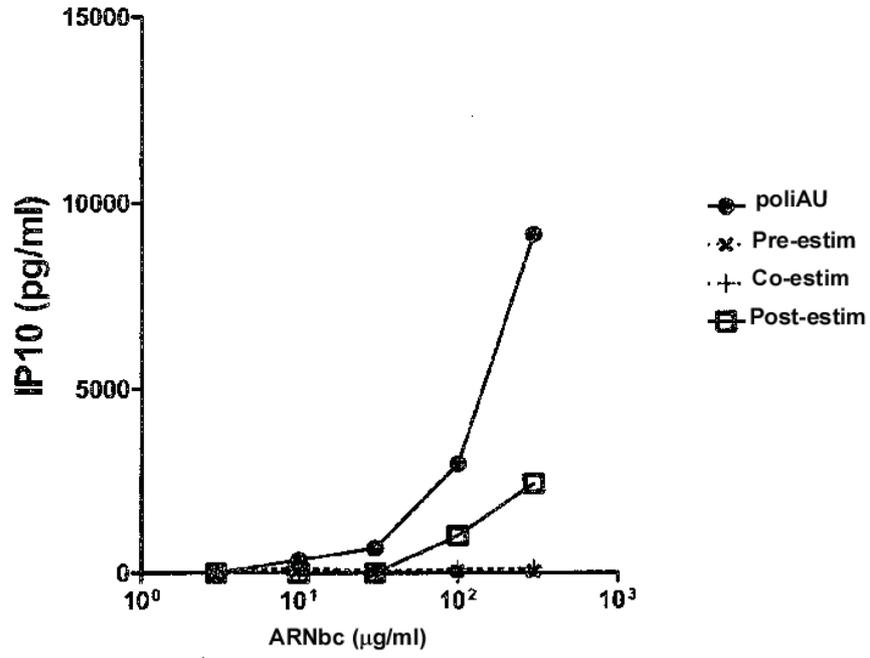


FIG. 12A

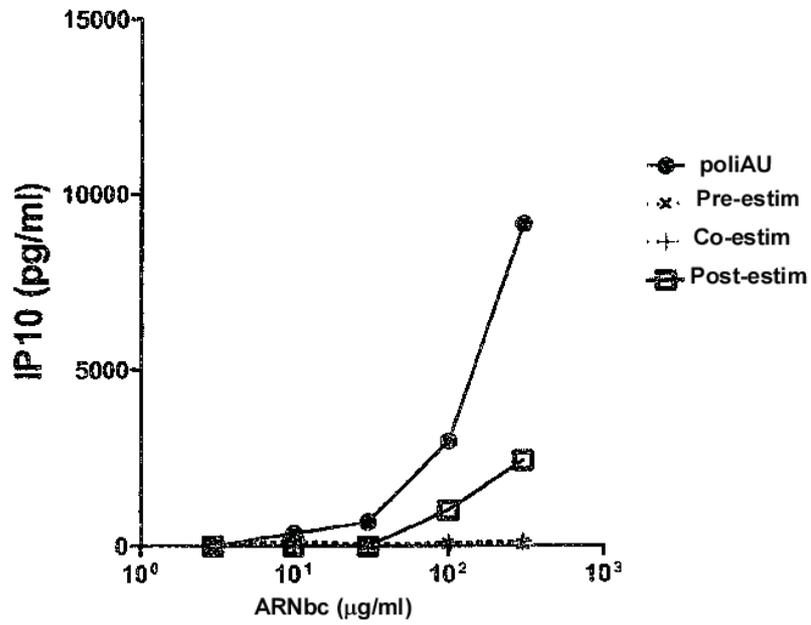


FIG. 12B

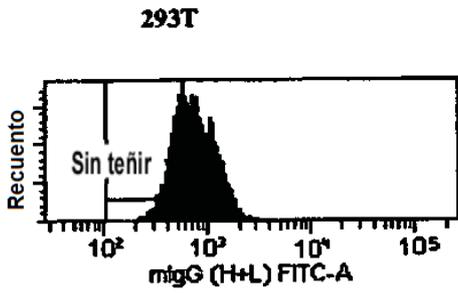


FIG. 13A

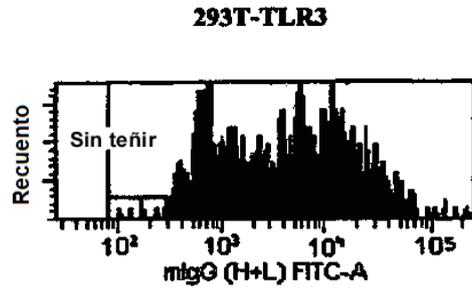


FIG. 13B

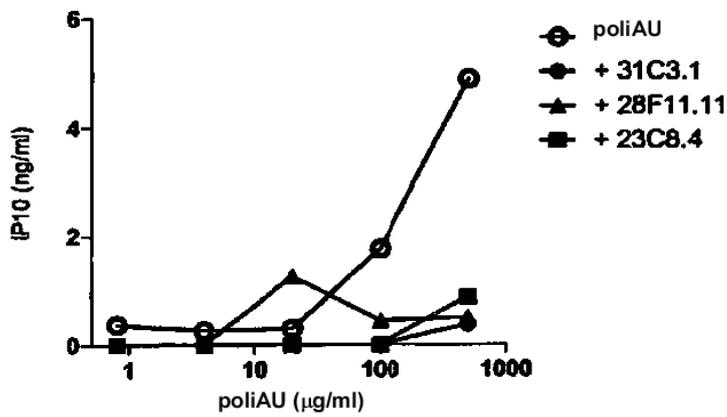


FIG. 14A

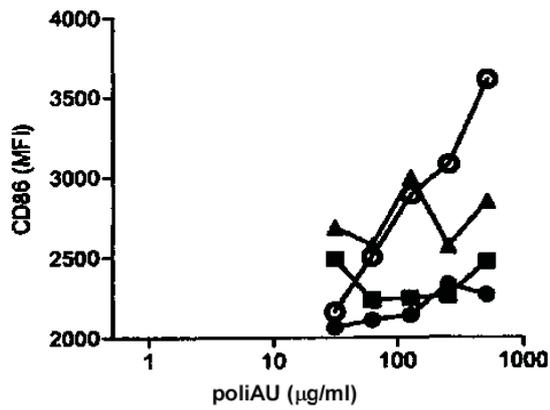


FIG. 14B

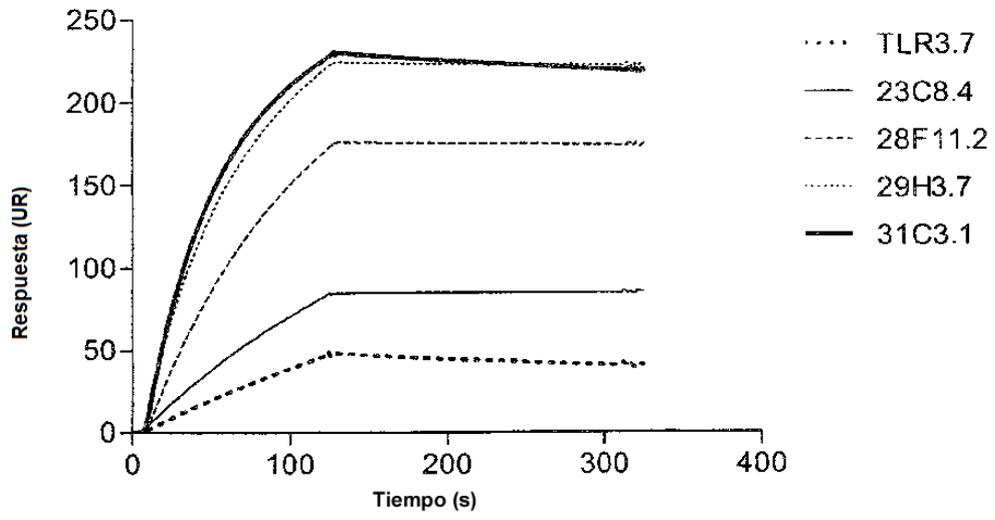


FIG. 15A

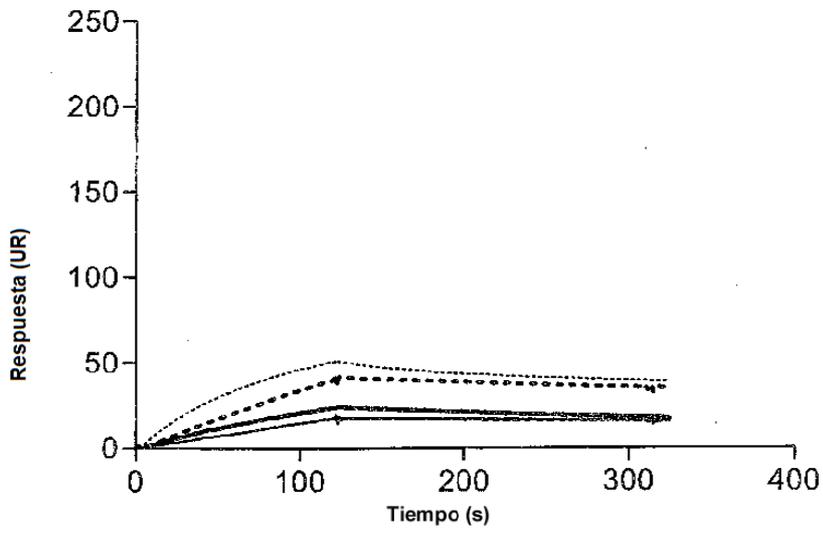


FIG. 15B

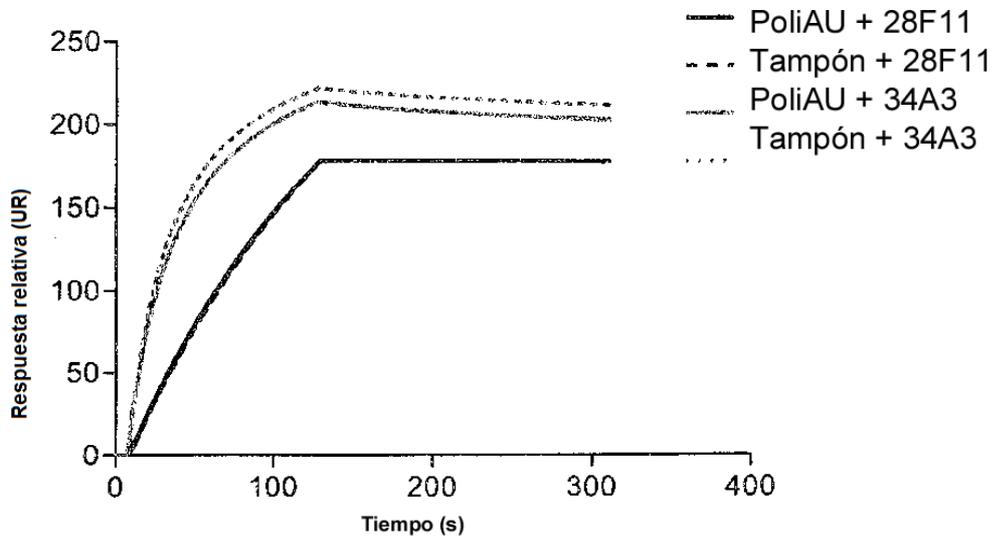


FIG. 16A

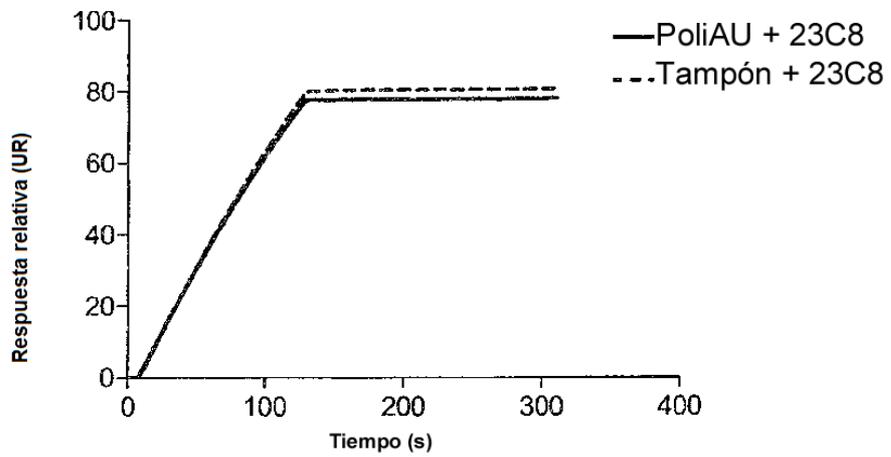


FIG. 16B

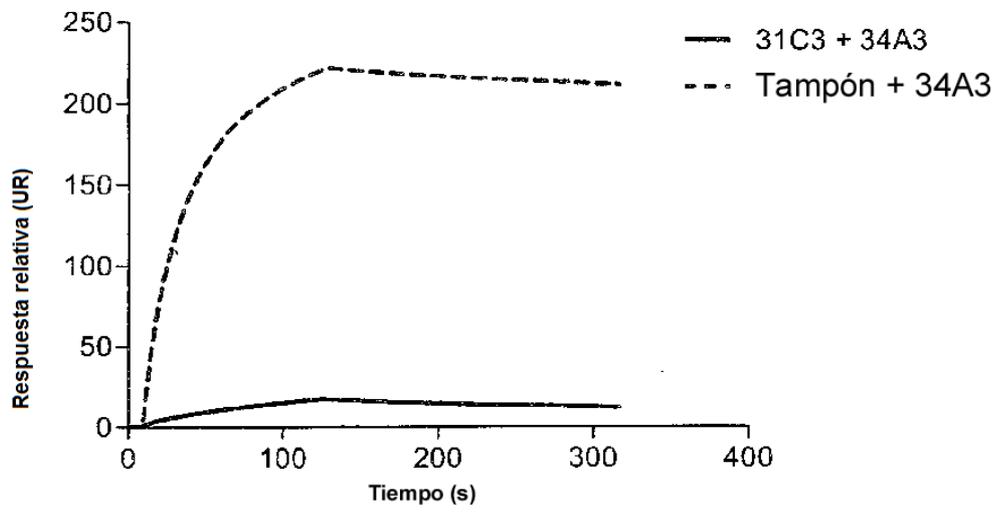


FIG. 17

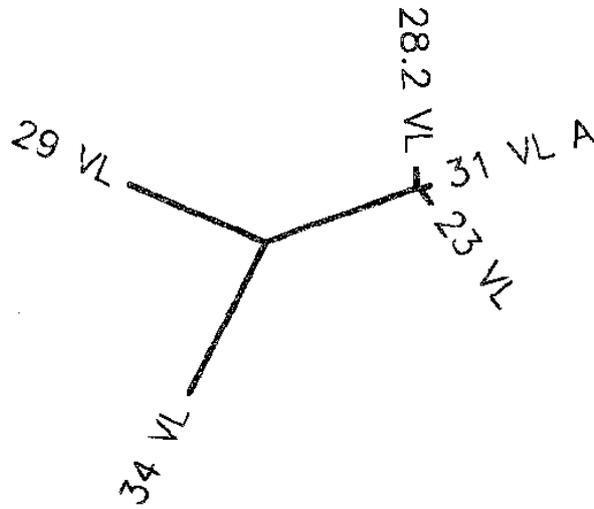


FIG. 18A

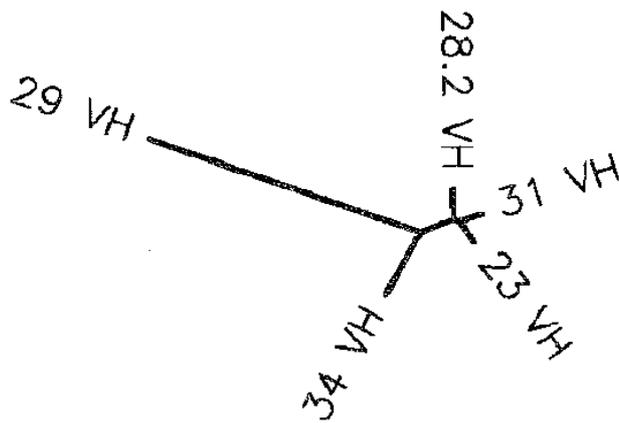


FIG. 18B

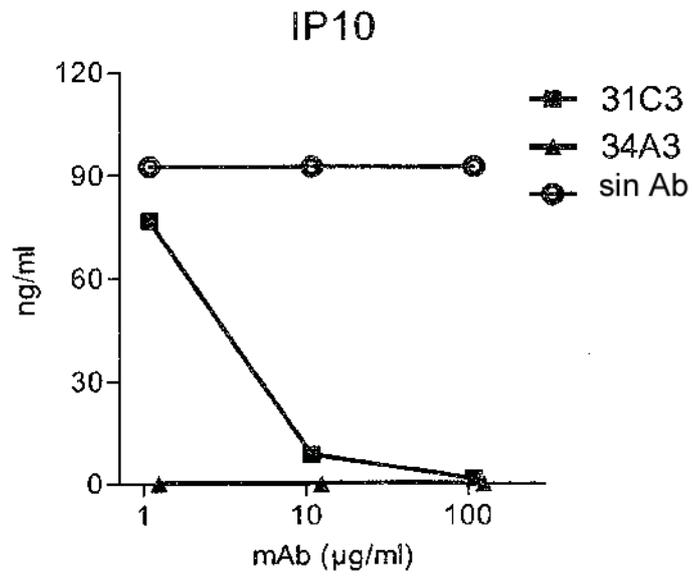


FIG. 19A

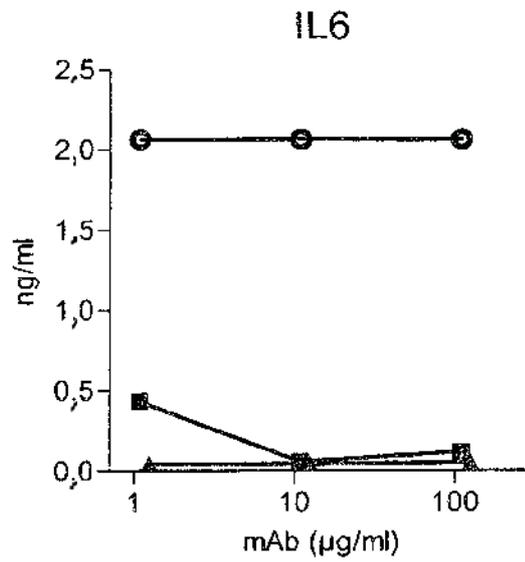


FIG. 19B

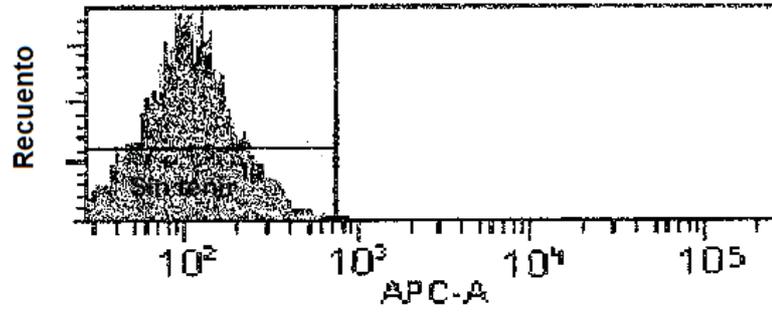


FIG. 20A

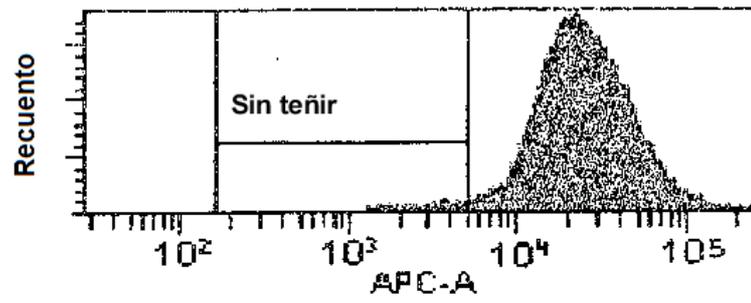


FIG. 20B

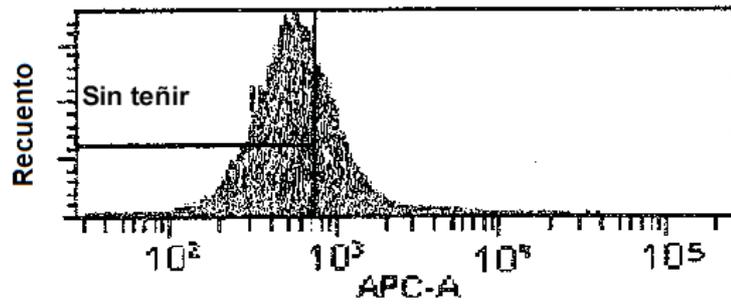


FIG. 20C

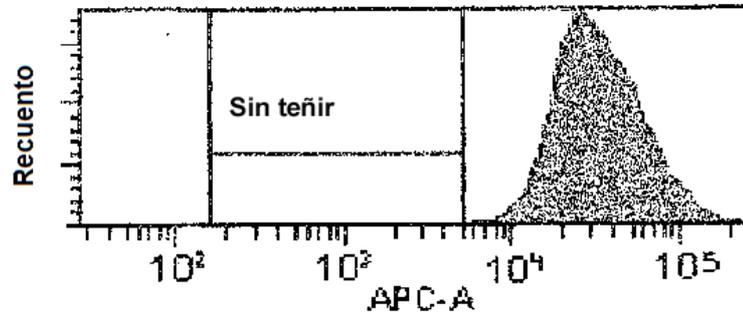


FIG. 20D

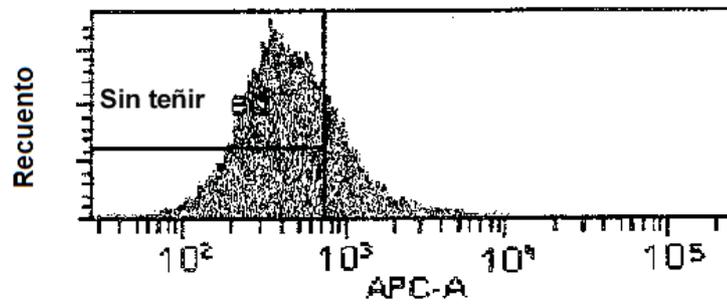


FIG. 20E

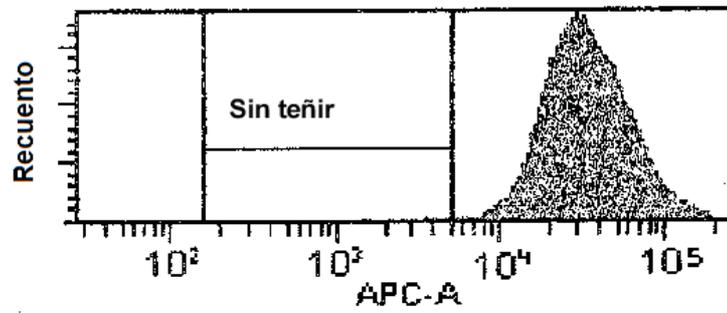


FIG. 20F