

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 264**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09818568 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2344175**

54 Título: **Métodos para suprimir la actividad de receptores tipo Toll**

30 Prioridad:

02.10.2008 US 102033 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JORDAN, JARRAT;
JUNG, SUN-YUNG;
SARISKY, ROBERT, T. y
SCHREITER, JESSICA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 550 264 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

Métodos para suprimir la actividad de receptores tipo Toll**5 Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a agentes que suprimen la translocación y actividad de los receptores tipo Toll, y métodos de uso de lo anterior.

10 Antecedentes de la Invención

15 Los receptores tipo Toll (TLR) regulan la activación de la respuesta inmune innata e influyen en la formación de inmunidad adaptativa detectando e iniciando cascadas de transducción de señales en respuesta a ligandos bacterianos, víricos, parasitarios y en algunos casos derivados del huésped (Lancaster et al., J. Physiol. 563:945-955, 2005). Los miembros de la familia TLR TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 están localizados en la membrana plasmática y activan las vías de señalización corriente abajo en respuesta a ligandos incluyendo componentes de proteínas o lípidos de bacterias y hongos. Los TLR3, TLR7 y TLR9 están localizados preferiblemente intracelularmente, y responden a ARNdc, ARNm y ADN CpG no metilado, respectivamente.

20 Los TLRs señalan a través del factor de diferenciación mieloide 88 de moléculas adaptadoras (MyD88), el dominio del receptor de Toll/IL-1 el dominio del receptor Toll/IL-1 que contiene el adaptador que induce el interferón beta (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con el TRIF (TRAM), iniciando las vías de señalización que implican la JNK/p38 quinasa, los factores reguladores de interferón (IFN) IFN-3, IFN-5 y IFN-7, y NF-kB, llevando a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Romagne, Drug Discov. Today 12:80-87, 2007). Se han identificado las regiones de TLR3 críticas para la señalización de receptores. Las mutaciones en residuos implicados en la glicosilación de proteínas, la formación de enlaces de disulfuros, loop 2 y secuencias de repetición ricas en leucinas (LRR) resultan en la señalización de TLR3 deficiente Ranjith-Kumar et al., J. Biol. Chem. 282:7668-7678, 2007; Ranjith-Kumar et al., J. Biol. Chem. 282:17696-17705, 2007; Sun et al., J. Biol. Chem. 281:11144-11151, 2006; Takada et al., Mol. Immunol. 44:3633-3640, 2007). La estructura cristalina de un complejo entre dos dominios extracelulares de TLR3 murinos y el ARNdc del ligando del TLR3 revelaron adicionalmente ligandos que enlazan con aminoácidos y regiones críticas para el pliegue y dimerización apropiados del TLR3 (Liu et al., Science 320:379-81, 2008). El TLR3 puede regularse también por corte y empalme alternativo. Se clonó una forma soluble del TLR3 en pollos (Yilmaz et al., Immunogenetics 56:743-53, 2005), y se ha identificado un ARNm de TLR3 humano que codifica una variante de corte y empalme con corte y empalme alternativo del exón 4 del TLR que resultó en 192 bp en la delección del marco (Yilmaz et al., Immunogenetics 56:743-53, 2005). La significancia funcional de las variantes de TLR3 descritas no se conoce.

35 La desregulación de la señalización del TLR se cree que provoca una multitud de problemas, y están en desarrollo estrategias terapéuticas hacia este eje (Hoffman et al., Nat. Rev. Drug Discov. 4:879-880, 2005; Rezaei, Int. Immunopharmacol. 6:863-869, 2006; Wickelgren, Science 312:184-187, 2006). Por ejemplo, están en desarrollo clínico antagonistas del TLR4 y TLRs 7 y 9 para sepsis y lupus severo, respectivamente (Kanzler et al., Nat. Med. 13:552-559, 2007).

45 La señalización del TLR3 se activa por ARNdc, ARNm o ARN liberado de células necróticas tras la inflamación o infección por virus. La activación del TLR3 resulta en la secreción inducida de interferones y citoquinas pro-inflamatorias, enfermedades inmunomediadas y autoinmunes, por ejemplo asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, choque séptico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, y diabetes de tipo I (Tabeta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 101:3516-3521, 2004; Underhill, Curr. Opin. Immunol. 16:483-487, 2004; Gaspari, J. Am. Acad. Dermatol. 54:S67-80, 2006; Van Amersfoort et al., Clin. Microbiol. Rev. 16:379-414, 2003; Miossec et al., Curr. Opin. Rheumatol. 16:218-222, 2004; Ogata and Hibi, Curr. Pharm. Res. 9:1107-1113, 2003; Takeda and Akira, J. Derm. Sci. 34:73-82, 2004; Doqusan et al., Diabetes 57:1236-1245, 2008).

55 Se ha demostrado que la expresión del TLR3 se correlaciona con respuestas inflamatorias asociadas con condiciones patológicas como cirrosis biliar primaria de los tejidos del hígado (Takii et al., Lab Invest. 85:908-920, 2005). Además, se ha descubierto que el TLR3 se sobreexpresa en articulaciones de pacientes con artritis reumatoide (Ospelt et al., Arthritis Rheum. 58:3684-92, 2008). El TLR3 juega un papel clave en la respuesta inmune tras la infección por virus. Por ejemplo, los animales deficientes en TLR3 muestran una ventaja de supervivencia sobre los animales del tipo salvaje tras infección por virus de gripe A, con la mejora de la supervivencia correlacionándose con niveles reducidos de mediadores pro-inflamatorios (Le Goffic et al., PLoS Pathog. 2:E53, 2006). Los animales deficientes en TLR3 también están protegidos de la ruptura epitelial de la mucosa inducida por la infección de rotavirus (Zhou et al. J. Immunology 178:4548-4556, 2007). En humanos, un alelo de TLR3 dominante-negativo se ha asociado con susceptibilidad aumentada a encefalitis por Herpes Simple tras la infección primaria con HSV-1 (Zheng et al., Science 317:1522-7 2007).

65

En condiciones necróticas, la liberación de contenido intracelular que incluye ARNm endógeno activa la secreción de citoquinas, quimioquinas y otros factores que inducen la inflamación local, facilitan la depuración de restos de células muertas y reparan el daño. La necrosis a menudo perpetúa los procesos inflamatorios, contribuyendo a la inflamación crónica o exagerada (Bergsbaken et al., Nature Reviews 7:99-109, 2009). La activación del TLR3 en el sitio de necrosis puede contribuir a estos procesos inflamatorios aberrantes y genera un bucle de retroalimentación positivo pro-inflamatorio adicional por los ligandos de TLR3 liberados. La modulación hacia abajo de la activación de TLR3 también puede representar una estrategia de tratamiento nueva para las indicaciones oncológicas que incluyen carcinomas de células renales y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Morikawa et al., Clin. Cancer Res. 13:5703-5709, 2007; Pries et al., Int. J. Mol. Med. 21: 209-15, 2008). También un alelo de TLR^{3L423F} previamente caracterizado que resultó en actividad de TLR3 reducida se asoció con la protección contra la degeneración macular relacionada con la edad "seca" avanzada (Yang et al., N. Engl. J. Med. 359:1456-63, 2008), indicando que los agentes antagonistas de TLR3 pueden ser beneficiosos en esta enfermedad.

Las patologías asociadas con las condiciones inflamatorias y otras, como aquellas asociadas con infecciones, tienen impactos de salud y económicos significativos. Aun así, a pesar de los avances en muchas áreas de la medicina, hay disponibles comparativamente pocas opciones de tratamiento y terapias para muchas de estas condiciones.

Por lo tanto, existe una necesidad de suprimir la actividad de TLR3 para tratar condiciones asociadas con el TLR3.

Breve descripción de los Dibujos

Figura 1. Secuencia de TLR3Δ64. El TLR3Δ64 tiene una delección de 64 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 289-353 en el polipéptido de TLR3 del tipo salvaje.

Figura 2. El TLR3Δ64 es deficiente en la señalización tras la estimulación de poli(I:C) y ejerce un efecto supresor en la activación inducida de poli(I:C) de NF - κB por TLR3 de tipo salvaje

Figura 3. Expresión de superficie (A, B, C) e intracelular (D, E, F) de TLR3 de tipo salvaje (línea sólida), TLR3Δ64 (línea punteada) y TLR3ΔTIR (línea discontinua) por FACS. El control de isoformas se indica en gris.

Resumen de la Invención

La invención proporciona un agente que interfiere con la translocación del receptor tipo Toll 3 (TLR 3), para su uso en la supresión en la actividad del TLR3 en un sujeto con necesidad de la misma, en el que el agente es una variante de TLR3 que no comprende los residuos de aminoácidos 289-352 del dominio extracelular del TLR3 del tipo salvaje representado por la SEQ ID NO: 4.

La invención también proporciona un agente que interfiere con la translocación del receptor tipo Toll 3 (TLR3), para su uso en la supresión de la actividad de TLR3 en un sujeto con necesidad de la misma, en el que el agente es una variante del TLR3, y en el que la variante del TLR3 comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

La invención también proporciona un agente que interfiere con la translocación del TLR3, en el que el agente es una variante del TLR3 de la invención, para su uso en el tratamiento o prevención de:

- a) una condición inflamatoria;
- b) una condición necrótica;
- c) una enfermedad infecciosa;
- d) una enfermedad cardiovascular;
- e) diabetes tipo I o tipo II;
- f) un cáncer;
- g) una enfermedad reumatoide;
- h) una enfermedad pulmonar; o
- i) un trastorno neurológico.

en el que el agente se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente con necesidad del mismo, durante un tiempo suficiente para tratar o evitar la condición o enfermedad.

Un aspecto de la divulgación es un método para suprimir la actividad del receptor tipo Toll 3 (TLR3) en un sujeto con necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto un agente que interfiere con la translocación del TLR3.

Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una condición inflamatoria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo

en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la condición inflamatoria.

5 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una condición necrótica que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la condición necrótica.

10 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la enfermedad infecciosa.

15 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la enfermedad cardiovascular.

20 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir diabetes tipo 1 o tipo 2 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la diabetes tipo 1 o tipo 2.

25 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir el cáncer.

30 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una enfermedad reumatoide que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la enfermedad reumatoide.

35 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir una enfermedad pulmonar que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar.

40 Otro aspecto de la divulgación es un método para tratar o prevenir un trastorno neurológico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad del mismo en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir el trastorno neurológico.

Descripción detallada de la Invención

45 Se debe entender que la terminología usada en la presente es con el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que sea limitativa. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que lo entendido comúnmente por alguien experto en la técnica a la que pertenece la invención.

50 Aunque se puede usar cualquier método y material similar a los descritos en la presente en la práctica para probar la presente invención, en la presente se describen materiales y métodos ejemplares. En la descripción y reivindicación de la presente invención se usará la siguiente terminología.

55 Como se usa en la presente, el término "supresión" o "suprimir" significa bloquear parcial o totalmente la estimulación, disminuyendo, evitando, retrasando la activación, inactivando o regulando hacia abajo la actividad del TLR3. La supresión de la actividad de los receptores tipo Toll se consigue cuando el valor de la actividad de los receptores tipo Toll en relación a la de control es del 50-80%, opcionalmente del 25-50% o del 0-25%, donde a las muestras de control se les asigna un valor de actividad del TLR3 relativo del 100%.

60 El término "agente" significa polipéptidos, péptidos o proteínas, proteínas de fusión, peptidomiméticos, anticuerpos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos y similares que enlazan con el TLR3, suprimen la actividad del TLR3 y tienen al menos una de las siguientes características: interfieren con o alteran la translocación del TLR3, interfieren o alteran la localización subcelular del TLR3, interfieren con la co-localización del TLR3 con su ligando. El agente puede identificarse usando ensayos para la actividad del TLR3 o ensayos para evaluar la translocación o localización subcelular del TLR3, sólo o evaluando también la localización del ligando del

65

TLR3. Ejemplos de agentes incluyen un polipéptido de variante de TLR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un polipéptido de variante de TLR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

5 El término "actividad de TLR3" o "actividad" como se usa en la presente se refiere a cualquier actividad que tienen lugar como resultado del enlace del ligando con el TLR3. Los ligandos de TLR3 incluyen ARNdc, poli(I:C) y ARNm endógeno, por ejemplo ARNm endógeno liberado de células necróticas. Una activación del receptor de TLR3 ejemplar resulta en la activación de NF- κ B en respuesta al ligando de TLR3. La activación de NF- κ B puede evaluarse usando un ensayo de gen indicador tras la inducción del receptor con poli(I:C) (Alexopoulos et al., Nature 413:732-738, 2001; Hacker et al., EMBO J. 18:6973-6982, 1999). Otra activación del receptor de TLR3 ejemplar resulta en la activación de los factores de respuesta de interferones (IRF-3, IRF-7) en respuesta al ligando de TLR3. La activación de IRF mediada por TLR3 puede evaluarse usando un gen indicador conducido por un elemento de respuesta estimulado por interferones (ISRE). Otra activación del receptor de TLR3 ejemplar resulta en la secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, por ejemplo, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IP-10 y RANTES. La liberación de citoquinas y quimioquinas de células, tejidos o en la circulación puede medirse usando inmunoensayos bien conocidos, como un inmunoensayo ELISA.

20 El término "tipo salvaje" o "WT2" se refiere a un gen o producto del gen que tiene las características de ese gen o producto del gen cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen del tipo salvaje es el que se observa más frecuentemente en una población y es por lo tanto designado arbitrariamente la forma "normal" o "de referencia" o "del tipo salvaje" del gen.

25 El término "variante de TLR3" se refiere a un polipéptido o polinucleótido que difiere de un polipéptido o polinucleótido de TLR3 de "tipo salvaje" de referencia y puede o no mantener las propiedades esenciales. Generalmente, las diferencias en las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más modificaciones por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no estar codificado por el código genético, y la sustitución, inserción o deleción puede o ser conservadora o no conservadora. Las inserciones y deleciones pueden ser de longitud variable, por ejemplo de entre 1-64 aminoácidos. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural como una variante de corte y empalme alélica, o puede ser de una variante que no se conoce sea de origen natural.

35 Como se usa en la presente, el término "negativo dominante" o "proteína negativa dominante" se refiere al producto de un gen mutante negativo dominante. El término "gen mutante negativo dominante" se refiere a un gen que codifica un producto de proteína que interfiere con la función del tipo salvaje u otras variantes del mismo gen o producto de gen. El término "negativo dominante" no se pretende que esté limitado en la manera en que la proteína negativa dominante interfiere con el funcionamiento de la proteína del tipo salvaje o en la manera en que la proteína negativa dominante está hecha. La proteína negativa dominante puede ser una variante de corte y empalme del TLR3 o fragmentos de la misma. Puede suprimir la actividad del TLR3 interfiriendo con la translocación del TLR3 o interfiriendo con la co-localización del TLR3 y sus ligandos. La proteína negativa dominante puede producirse sintéticamente. El término "negativo dominante" también se pretende que incluya productos de variantes de corte y empalme o genes mutantes que proporcionan supresión parcial o alteración de la función, y no se pretende que requiera la supresión total.

45 Como se usan en la presente, las frases "interfiere con la translocación" e "interfiere con la localización" pueden usarse de manera intercambiable y se refieren a alterar parcial o completamente, dificultar o intervenir con la translocación o la localización subcelular, o alterar la tasa de dicha translocación del TLR3.

50 Como se usa en la presente los términos "translocar", "transloca", "translocado", "translocación" o "translocando" se refieren al movimiento del TLR3 desde un compartimento intracelular a otro, por ejemplo, desde un compartimento subcelular a otro compartimento subcelular. El movimiento del TLR3 puede tener lugar por ejemplo, desde el retículo endoplasmático (ER) al complejo de Golgi, desde el ER al endosoma, desde el ER al lisosoma, desde la membrana plasmática al endosoma, y desde la membrana plasmática al lisosoma. El movimiento del TLR3 puede depender de cualquiera de los sistemas de transporte vesicular bien caracterizados, por ejemplo a través de vesículas revestidas de clatrina, movimiento dependiente de caveolina, o movimiento dependiente de Cplor COPII (Mancias y Goldberg, Traffic 6:278-85, 2005; van der Goot y Gruenberg, Trends Cell. Biol. 16:514-521, 2006; Parton y Richards, Traffic 4:724-38, 2003), o un mecanismo nuevo todavía por caracterizar.

60 Los métodos para detectar la translocación y la localización intracelular del TLR3, la co-localización del TLR3 con sus ligandos, por ejemplo poli(I:C) u ODN2006, otros receptores tipo Toll, por ejemplo TLR7 o TLR9, cualquier estructura celular o proteína celular, por ejemplo retículo endoplasmático, endosoma, lisosoma o membrana plasmática y proteínas residentes de los mismos, y métodos para detectar la concentración del TLR3 en la superficie celular o intracelularmente son bien conocidos. Los métodos ejemplares son microscopía fluorescente de polipéptidos o moléculas intrínsecamente fluorescentes o etiquetados, fraccionamiento de células y métodos de

clasificación de células (Meyer y Teruel, Trends in Cell Biol. 13:101-106, 2003; Giepmans et al., Science 312:217-224, 2006; Watson et al., Advanced Drug Delivery Reviews 57:43-61, 2005; Kumar et al., Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 106:1-18, 2007; Tung et al., Clin. Lab. Med. 27:453-468, 2007). Por ejemplo, la localización celular de TLR3 sobreexpresado puede detectarse con anticuerpo anti-TLR3 específico seguido por un anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente usando microscopía fluorescente. La localización del TLR3 también puede evaluarse usando ensayo FACS utilizando anticuerpos anti-TLR3.

Como se usa en la presente "compartimento subcelular" se refiere a cualquier componente macromolecular sub-estructural de la célula ya esté hecho de proteína, lípido, carbohidrato, o ácido nucleico. Puede ser un ensamblaje macromolecular o un orgánulo (un componente celular delimitado por la membrana). Ejemplos de compartimentos subcelulares son citoplasma, núcleo, membrana plasmática, Golgi, Red trans-Golgi, lisosoma, endosoma, retículo endoplasmático, espacio extracelular, y la mitocondria.

Como se usa en la presente, el término "co-localización" o "co-localizado" se refiere a dos o más moléculas que tienen localización idéntica o superpuesta en la célula. La co-localización de moléculas y proteínas puede detectarse usando microscopía fluorescente en células fijadas o vivas. Por ejemplo, el TLR3 y su poli(I:C) del ligando puede ser co-localizado en células usando poli(I:C) etiquetado por fluorescencia, anticuerpos primarios anti-TLR3 y anticuerpos secundarios conjugados por Alexa Fluor®647. Los métodos de co-localización de moléculas celulares son bien conocidos.

"Expresión de superficie" se refiere a la cantidad de polipéptidos de TLR3 que se encuentran en la membrana plasmática.

Un "compartimento endosómico" o "endosoma" es un compartimento vesicular intracelular, por ejemplo, un orgánulo que está implicado en la exportación de sustancias químicas incluyendo biomoléculas como lípidos y proteínas desde las células, la internalización y reciclaje de dichas biomoléculas desde la membrana plasmática, a y desde compartimentos subcelulares, y la translocación de dichas biomoléculas entre compartimentos subcelulares. Ejemplos de compartimentos endosómicos incluyen el compartimento de reciclaje perinuclear (PRC), los endosomas de reciclaje, las vesículas secretoras y la red de trans-Golgi (TGN).

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula que enlaza específicamente con un antígeno, e incluye anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos, y anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos. También, el anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento funcional de una molécula de anticuerpo, como un fragmento que mantiene al menos su función de enlace con el antígeno, e incluye Fab, F(ab'), F(ab')₂, scFv, dsFv, y diacuerpo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando enzimas proteolíticas (por ejemplo, un anticuerpo completo se digiere con papaina para producir fragmentos Fab, y el tratamiento con pepsina resulta en la producción de fragmentos F(ab')₂). Las técnicas para la preparación y uso de los varios anticuerpos son bien conocidas en la técnica (Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1987-2001; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Colligan, et al., ed., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY 1994-2001; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, 1997-2001).

El término "ligando" se refiere a un oligonucleótido, resto de ARN sintético o endógeno, péptido o polipéptido que enlaza con, o forma complejos con, un receptor de TLR3 humano o variante del mismo, como el poli(I:C) (Alexopoulou et al., Nature 413:732-738, 2001) o ODN2006 (Ranjith-Kumar et al., Mol Cell Biol. 28:4507-19, 2008). El ligando puede ser un antagonista, inhibidor, supresor, agonista, estimulador o activador, o similar, del TLR3.

La presente invención se refiere a agentes que interfieren con la translocación del TLR3 y usos de dichos agentes. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento no esperado de que se descubrió una variante de corte y empalme de origen natural del TLR3, denominada en la presente TLR3Δ64, interfería con la translocación y actividad del TLR3. Por ejemplo, se identificó que los residuos de aminoácidos 289-352 del dominio extracelular del TLR3 del tipo salvaje (GenBank N° de Acceso NM_003265 SEQ ID NO: 4) eran responsables de la salida del TLR3 del ER, de la localización de la membrana plasmática y endosómica, y de la capacidad del TLR3 de co-localizar con sus ligandos. Los agentes ejemplares incluyen un polipéptido de la variante TLR3Δ64 de TLR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un dominio extracelular del polipéptido de TLR3Δ64 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. También se divulga un polipéptido que comprende los aminoácidos 289-352 del TLR3 de WT mostrados en la SEQ ID NO: 3. La secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de NF-κB resultante de la activación del TLR3 ha sido asociada con un espectro de condiciones humanas. Por lo tanto, estos agentes son útiles como reactivos de investigación y agentes terapéuticos.

Un aspecto de la divulgación es un método para suprimir la actividad del receptor tipo Toll 3 (TLR3) en un sujeto con necesidad de ello, que comprende administrar al sujeto un agente que interfiere con la translocación del

TLR3. Se cree que el TLR3 localizado en el retículo endoplasmático se transloca a endosomas que contienen ARNdc en respuesta a la estimulación del ARNdc, un proceso que requiere la proteína ER-residente (Johnsen et al., EMBO J. 25:3335-3346, 2006; Kim et al., Nature 452:234-238, 2008). Los residuos de TLR3 implicados en la regulación de la translocación del receptor son el dominio de la transmembrana (aminoácidos 707-728 de la SEQ ID NO: 4) que enlaza con Unc93B1 y la región del conector citosólico (aminoácidos 727-749 de la SEQ ID NO: 4) que también se ha demostrado que es responsable de la localización endosómica del TLR3 (Funami et al., Int. Immunol. 16:1143-1154, 2004; Nishiva et al., J. Biol. Chem. 280:37107-37117, 2005; US2006/0265767A1). Las mutaciones de UNC93B1 anulan la translocación inducida por ligandos normal y la señalización de todos los TLRs de detección de ácidos nucleicos actualmente conocidos TLR3, TLR7 y TLR9 (Tabeta et al., Nat. Immunol. 7: 156-164, 2006; Brinkmann et al., J. Cell. Biol. 177:265-275, 2007). Otras proteínas y vías implicadas en el tráfico y señalización de los miembros de la familia TLR incluyen el PRAT4A, un residente de ER que se asocia con el TLR9 (Takahashi et al., J. Exp. Med. 204:2963-2976, 2007) y la dinamina, una GTPasa esencial para la formación de vesículas recubiertas dependientes de la clatrina. La inhibición de la dinamina evitó la internalización inducida por LPS del TLR4, un proceso requerido para la producción del interferón tipo I (Kagan et al., Nat. Immunol. 9:361-368, 2008). Por lo tanto, la translocación normal de los TLRs se requiere para la señalización del receptor, y por lo tanto los agentes que modulan la translocación del TLR pueden tener una utilidad terapéutica. La modulación específica de la translocación del TLR3 puede tener el beneficio de derivar los efectos pleiotrópicos resultantes de la inhibición de las moléculas implicadas en la translocación de receptores múltiples o mecanismos de transporte vesicular ampliamente usados, como el UNC93B1 o la dinamina, resultando en efectos menos sustanciales en la inmunidad del huésped del agente terapéutico.

Aunque no se desea estar limitado a ninguna teoría particular, se piensa que el agente de la invención interfiere con la translocación del TLR3 enlazando y formando complejos con el TLR3 del tipo salvaje y posteriormente enmascarando o interfiriendo con las señales de translocación del TLR3, o evitando la dimerización del TLR3 requerida para la actividad del receptor apropiada incluyendo quizás la internalización. El agente que interfiere con la translocación del TLR3 puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo reactivo con el dominio extracelular del TLR3. Se contempla que un anticuerpo reactivo con el TLR3 pueda interferir con la translocación y actividad del TLR3 enmascarando la señal codificada por estos aminoácidos al regular la translocación del TLR3. Los anticuerpos ejemplares son anticuerpos reactivos con los aminoácidos 289-352 del polipéptido del TLR3 del tipo salvaje mostrados en la SEQ ID NO: 3.

Es posible modificar la estructura de los polipéptido o fragmentos de la invención para tales propósitos como mejorar la especificidad, estabilidad, solubilidad y similares del sustrato. Por ejemplo, se puede producir un polipéptido modificado en el que la secuencia de aminoácidos se ha alterado, como por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (es decir, mutaciones conservadoras) no tendrá, en algunas situaciones pero no todas, un efecto mayor en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados pueden dividirse en cuatro familias; (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y (4) polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano, y la tirosina son clasificados algunas veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. De una manera similar, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácido (aspartato, glutamato); (2) básico (lisina, histidina, arginina), (3) alifático (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), con la serina y la treonina siendo agrupadas opcionalmente separadamente como alifático-hidroxilo; (4) aromático (fenilalanina, tirosina, triptófano); (5) amida (asparagina, glutamina); y (6) que contienen azufre (cisteína y metionina) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2ª ed, WH Freeman and Co., 1981). Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o fragmento del mismo resulta en un homólogo funcional puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido o fragmento modificado para producir una respuesta de una manera similar al polipéptido o fragmento no modificado usando los ensayos descritos en la presente. Los péptidos, polipéptidos o proteínas en las que ha tenido lugar más de un reemplazo pueden probarse fácilmente de la misma manera.

El agente que interfiere con la translocación del TLR3 puede conjugarse con un segundo polipéptido para formar una proteína de fusión que puede conferir propiedades deseables, por ejemplo estabilidad aumentada. Proteínas de fusión ejemplares pueden formarse conjugando juntos el polipéptido de TLR3Δ64 variante del TLR3 que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un dominio extracelular del polipéptido de TLR3Δ64 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y un supercóntigo alternativo como la proteína de repetición ankyrin diseñada (DARPs) (Stumpp y Amstutz, Curr. Opin. Durg Discov. Devel. 10:153-159, 2007), el constructo MIMETIBODU™ (Picha et al. Diabetes 57:1926-1934, 2008), otros dominios de proteínas o péptidos específicos para el TLR3. Las proteínas de fusión pueden generarse habitualmente usando o métodos de ácidos nucleicos recombinantes o por métodos de síntesis química bien conocidos en la técnica.

La presente divulgación describe métodos para tratar o prevenir una variedad de estados de enfermedad de

mamíferos en los que la supresión de la actividad del TLR3 es deseable interfiriendo con la translocación del TLR3, por ejemplo condiciones inflamatorias, enfermedades infecciosas, condiciones necróticas, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I, diabetes tipo II, cáncer, enfermedad reumatoide, enfermedad pulmonar y trastornos neurológicos.

5 Los agentes que interfieren con la translocación del TLR3 pueden usarse en los métodos de prevención y tratamiento descritos en la presente. Por ejemplo, son útiles el polipéptido de TLR3Δ64 variante del TLR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, un dominio extracelular del polipéptido de TLR3Δ64 que
10 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

15 Los métodos descritos en la presente pueden usarse para tratar a un sujeto con necesidad de tratamiento. "Sujeto" se refiere a cualquier animal, preferiblemente un paciente humano, ganado o animal doméstico. Sin desear estar limitado a ninguna teoría particular, se cree que el beneficio terapéutico de los agentes que interfieren con la translocación del TLR3 se deberá a la capacidad de dichos agentes de inhibir la activación de NF-κB y/o IRF3 inducida por ligandos del TLR3 resultando en una secreción de quimiocinas y citoquinas, e interferones tipo I, respectivamente, considerando que se sabe que la desregularización de las moléculas inmunomoduladoras anteriormente mencionadas está implicada in muchas condiciones inflamatorias.

20 Las cantidades de un agente dado suficientes para tratar o prevenir una condición dada pueden determinarse fácilmente. En los métodos descritos en la presente, el agente puede administrarse individualmente o en combinación con al menos otra molécula. Dichas moléculas adicionales pueden ser moléculas con un beneficio terapéutico no mediado por la señalización del receptor de TLR3. Los antibióticos, antivirales, paliativos y compuestos que reducen los niveles o la actividad de citoquina son ejemplos de dichas moléculas adicionales.
25 Dichas moléculas adicionales pueden ser un anticuerpo, constructo MIMETYBODY™, oligonucleótido, o moléculas específica para el TLR3 u otro receptor del TLR3. "En combinación con" como se usa en la presente significa que los agentes descritos pueden administrarse a un sujeto juntos en una mezcla, concurrentemente como agentes individuales o secuencialmente como agentes individuales en cualquier orden.

30 En otra realización, se describe un método para tratar o prevenir una condición inflamatoria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente a un paciente con necesidad en el que el agente interfiere con la translocación del TLR3 durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la condición inflamatoria.

35 Generalmente, las condiciones inflamatorias, las condiciones asociadas con infecciones o los trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente que se pueden prevenir o tratar por los métodos de la divulgación incluyen los mediados por citoquinas y las condiciones resultantes total o parcialmente de la activación del TLR3 o la señalización por la vía del TLR3. Ejemplos de dichas condiciones inflamatorias incluyen condiciones asociadas con sepsis, enfermedades inflamatorias del intestino, trastornos autoinmunes, trastornos inflamatorios y condiciones asociadas con infecciones.

40 Un ejemplo de dichas condiciones inflamatorias es la condición asociada con sepsis que puede incluir el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), choque séptico o síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS). Aunque no se desea estar limitado a ninguna teoría particular, se cree que el tratamiento con agentes que interfieren con la translocación de TLR3 puede proporcionar un beneficio terapéutico extendiendo los tiempos de supervivencia en pacientes que sufren de condiciones inflamatorias asociadas con sepsis o prevenir que un evento inflamatorio local (por ejemplo en el pulmón) se extienda a una condición sistémica, potenciando la actividad antimicrobiana innata, demostrando actividad sinérgica cuando se combina con agentes antimicrobianos, minimizando el estado inflamatorio local que contribuye a la patología, o cualquier combinación de los anteriores.
45 Dicha intervención puede ser suficiente para permitir el tratamiento adicional (por ejemplo, tratamiento de la infección subyacente o reducción de los niveles de citoquinas) necesario para asegurar la supervivencia del paciente.

50 Otro ejemplo de dichas condiciones inflamatorias es la enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Los expertos en la técnica reconocerán otras enfermedades inflamatorias del intestino de etiología conocida o desconocida que provocan inflamación del intestino.
55

Otro ejemplo de dichas condiciones inflamatorias es una condición pulmonar inflamatoria. Las condiciones inflamatorias pulmonares ejemplares incluyen condiciones pulmonares inducidas por infecciones incluyendo las asociadas con infecciones víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias o priónicas; condiciones pulmonares inducidas por alérgenos; condiciones pulmonares inducidas por contaminantes como asbestosis, silicosis, o beriliosis; condiciones pulmonares inducidas por aspiración gástrica, desregularización inmune, condiciones pulmonares inflamatorias inducidas genéticamente como fibrosis quística y condiciones pulmonares inducidas por traumas físicos, como lesión del ventilador. Estas condiciones inflamatorias también incluyen asma, enfisema, bronquitis, EPOC, sarcoidosis, histiocitosis, linfangiomatosis, lesión pulmonar aguda, síndrome de distrés respiratorio agudo, enfermedad pulmonar crónica, displasia broncopulmonar, neumonía adquirida en comunidad, neumonía
60
65

nosocomial, neumonía asociada al ventilador, sepsis, neumonía viral, infección por gripe, infección por parainfluenza, infección por metapneumovirus humano, infección por virus sincitial respiratorio y aspergillus u otras infecciones fúngicas.

5 Las enfermedades inflamatorias asociadas con infecciones ejemplares pueden incluir neumonía vírica o bacteriana, incluyendo neumonía grave, fibrosis quística, bronquitis, exacerbaciones de la vía aérea y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Dichas condiciones asociadas con infecciones pueden implicar infecciones múltiples como una infección vírica primaria y una infección bacteriana secundaria.

10 Otras condiciones inflamatorias y neuropatías, que pueden prevenirse o tratarse por el método de la divulgación son las provocadas por enfermedades autoinmunes. Estas condiciones y neuropatías también incluyen esclerosis múltiple, lupus eritematoso de esclerosis y trastornos neurodegenerativos y del sistema nervioso central (CNS) incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, trastorno bipolar y esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedades del hígado incluyendo fibrosis, virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB), diabetes y resistencia a la insulina, trastornos cardiovasculares, incluyendo apoplejía e infarto de miocardio, artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica y artritis reumatoide juvenil (JRA), osteoporosis, osteoartritis, pancreatitis, fibrosis, encefalitis, psoriasis, arteritis de células gigantes, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), condiciones inflamatorias de la piel, trasplante, cáncer, alergias, enfermedades endocrinas, reparación de heridas otros trastornos autoinmunes, hiper-respuesta de las vías respiratorias e infecciones o trastornos mediados por células, virus o priones.

25 Los cánceres ejemplares incluyen al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitadas a, al menos una de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), células B, células T o FAB ALL, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células capilares, síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de mama, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome/hipercalcemia paraneoplásico de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, sarcomas, melanoma maligno, particularmente melanoma metastásico, hemangioma, enfermedad metastásica, cáncer relacionado con la resorción ósea, cáncer relacionado con dolor óseo, y similares.

35 Las enfermedades cardiovasculares ejemplares pueden incluir al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de síndrome de aturdimiento cardiaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, apoplejía, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, restenosis, enfermedad aterosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, choque, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardiaca, cor pulmonal, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos ectópicos auriculares, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome post perfusión, respuesta inflamatoria de derivación cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia de QRS estrecho regular, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo de ramificaciones, trastornos isquémicos del miocardio, enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, cardiomiopatía restrictiva, enfermedades cardíacas valvulares, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad aterosclerótica periférica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, varices, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome post bombeo, lesión por isquemia-reperfusión, y similares.

50 Las enfermedades neurológicas ejemplares pueden incluir al menos una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza por migraña, complejo de demencia del SIDA, las enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple y mielitis transversa aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelosos tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos del movimiento hipercinéticos tales como corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos del movimiento hipocinéticos, como enfermedad de Parkinson; Parálisis progresiva del supranúcleo; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelosas, como la ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia telangiectasia y trastorno multisistémico mitocondrial); trastornos del núcleo desmielinizantes, como esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda; y trastornos de la unidad motora como atrofiás musculares neurogénicas (degeneración de las células del cuerno anterior, como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; Síndrome de Down en la mediana edad; enfermedad de cuerpos de Lewy

difusa; demencia senil del tipo de cuerpo de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz; y demencia pugilística, y similares.

5 Las condiciones fibróticas ejemplares pueden incluir fibrosis hepática (incluyendo pero no limitado a cirrosis inducida por el alcohol, cirrosis inducida por virus, hepatitis autoinmune inducida); fibrosis pulmonar (incluyendo pero no limitado a esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática); fibrosis renal (incluyendo pero no limitado a esclerodermia, nefritis diabética, nefritis glomerular, nefritis por lupus); fibrosis dérmica (incluyendo pero no limitado a esclerodermia, cicatrización hipertrófica y queloides, quemaduras); mielofibrosis; neurofibromatosis; fibroma; fibrosis intestinal; y adherencias fibróticas resultantes de procedimientos quirúrgicos. En dicho método, la fibrosis puede ser fibrosis específica de órganos o fibrosis sistémica. La fibrosis específica de órganos puede estar asociada con al menos una de fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis vascular, fibrosis de la piel, fibrosis del ojo, fibrosis de médula ósea u otra fibrosis. La fibrosis pulmonar puede estar asociada con al menos una de fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por fármacos, asma, sarcoidosis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La fibrosis hepática puede estar asociada con al menos una de cirrosis, esquistosomiasis o colangitis. La cirrosis puede seleccionarse de cirrosis alcohólica, cirrosis post-hepatitis C, cirrosis biliar primaria. La colangitis es la colangitis esclerosante. La fibrosis renal puede estar asociada con al menos una de nefropatía diabética y glomeruloesclerosis por lupus. La fibrosis cardíaca puede estar asociada con al menos un tipo de infarto de miocardio. La fibrosis vascular puede estar asociada con al menos una de restenosis arterial postangioplastia, o aterosclerosis. La fibrosis de la piel puede estar asociada con al menos una de cicatrices por quemaduras, cicatrices hipertróficas, queloides, o dermatopatía fibrosante nefrogénica. La fibrosis del ojo puede estar asociada con al menos una de mielofibrosis idiopática o mielofibrosis inducida por fármacos. Las otras fibrosis pueden seleccionarse de enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren o dermatomiositis. La fibrosis sistémica puede seleccionarse de esclerosis sistémica y enfermedad de injerto contra huésped.

25 La "cantidad terapéuticamente efectiva" del agente efectiva en el tratamiento o prevención de las condiciones donde es deseable la supresión de la actividad del TLR3 puede determinarse por técnicas de investigación estándar. Por ejemplo, la dosificación del agente que será efectiva en el tratamiento o prevención de la condición inflamatoria como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa puede determinarse administrando el agente a un modelo animal de la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, como animales que han ingerido dextrano sulfato de sodio (DSS) (Okayasu et al, Gastroenterología 98: 694 a 702, 1990).

35 Adicionalmente, se pueden emplear opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La selección de una dosis efectiva particular puede determinarse (por ejemplo a través de ensayos clínicos) por un experto en la técnica en base a la consideración de varios factores. Dichos factores incluyen la enfermedad a ser tratada o prevenida, los síntomas implicados, la masa corporal del paciente, el estado inmunológico del paciente y otros factores conocidos por el experto en la técnica. La dosis precisas a ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la seriedad de la emaciación relacionada con la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos in vitro o animales. La dosis del agente a ser administrado a un paciente, como un humano es más bien ampliamente variable y puede someterse a juicio independiente. Es a menudo práctico administrar la dosis diaria del agente en varias horas del día. Sin embargo, en cualquier caso dado, la cantidad del agente administrado dependerá de tales factores como la solubilidad del agente, la formulación usada, la condición del paciente (como el peso), y/o la vía de administración.

50 El modo de administración para el uso terapéutico del agente de la invención puede ser cualquier vía adecuada que administre el agente al huésped. Las proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusión, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y composiciones farmacéuticas de estos agentes son particularmente útiles para la administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intranasal.

55 El agente de la invención puede prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva del agente como un ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Por ejemplo se puede usar un 0,4% de solución salina y un 0,3% de glicina. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia particular. Pueden esterilizarse por técnicas de esterilización bien conocidas convencionales (por ejemplo filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración del agente de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de alrededor del 0,5%, habitualmente a o al menos alrededor del 1% a tanto como el 15 o el 20% por peso y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de

administración seleccionado. Los métodos actuales para preparar composiciones parenteralmente administrables son bien conocidos y se describen con más detalle en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack publishing Company, Easton, PA.

5 La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son meramente para ilustrar aspectos de la presente invención y no se pretende que sean limitaciones a esta invención.

10 **Ejemplo 1**

El TLR3Δ64 se expresa en células primarias

15 EL TLR3Δ64 es una variante de TLR3 de origen natural que se ha informado anteriormente que tiene un delección de 64 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 289-353 en el polipéptido de TLR3 del tipo salvaje (GenBank N° de Acceso NM_003265; SEQ ID NO: 4) (Yilmaz et al. Immunogenetics. 56:743-53, 2005). La función de la variante no se conoce. En este estudio, la secuencia del TLR3Δ64 se identificó y la variante se mostró expresada en células humanas primarias, incluyendo células epiteliales bronquiales humanas.

20 La expresión se evaluó por PCR usando los cebadores de oligonucleótidos 5'GATCTGTCTCATAATGGCTTGTC A 3' (SEQ ID NO: 5) y 5'GTTTATCAATCCTGTGAACATAT 3' (SEQ ID NO: 6) de acuerdo con Yang et al., (Yonesei Medical Journal 45:359-361, 2004) usando procedimientos estándar (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª ed. Vols 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Current protocols in molecular biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc, New York, 1997). Brevemente, se obtuvieron astrocitos humanos normales primarios (NHA) y se cultivaron como se recomienda por el proveedor (Lonza, Ltd). Se obtuvo una línea celular epitelial bronquial (BEAS-2B) de la ATCC (cat# CRL-9609™) y se cultivó como se recomienda para células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) por Lonza. Las células NHBE se cultivaron a diferenciación completa como se ha descrito previamente (Krunkosky et al., Am. J. Respir. Cell mol. Biol. 22:685-692, 2000; Krunkosky et al., Microb. Patholog. 42:98-103, 2007). Las células HEK293T, tanto no transfectadas como transfectadas transitoriamente con TLR3 del tipo salvaje o TLR3Δ64 se usaron como un control positivo y se cultivaron en DMEM (Gibco) que contenía un 10% de FBS (Gibco). El ARN se aisló y purificó de todos los tipos de células usando el kit Qiagen RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó transcripción inversa usando un kit de síntesis de ADNc BIO-RAD iScript. Los productos se separaron en un 1% de gel de agarosa. Los resultados del RT-PCR mostraron la presencia de dos bandas en células NHA y BEAS-2B que migraron a aproximadamente 684 bp y 492 bp (datos no mostrados). La banda de 684 bp correspondiente con el TLR3 del tipo salvaje y la banda de 492 bp correspondiente con el TLR3Δ64, y las bandas co-migraron con bandas de las muestras de control amplificadas de células HEK293T que expresaban o el constructo del tipo salvaje o el de TLR3Δ64, respectivamente. También se evaluó la expresión del TLR3Δ64 en células NHBE. Los resultados del RT-PCR mostraron la presencia de un producto de la amplificación de 492 bp en células NHBE que se correspondía con el TLR3Δ64, además de un producto de 684 bp que se correspondía con el TLR3 del tipo salvaje. La banda de aproximadamente 492 bp amplificada de células NHA, BEAS-2B y NHBE se extirpó y se purificó con gel usando el kit Qiagen's QIAquick Gel Extraction. El ADN purificado se clonó en el vector TOPO pCR4 de Invivogen y se secuenció usando el BigDye Terminator de ABI. La secuencia de nucleótidos resultante se tradujo para mostrar la secuencia de aminoácidos de la proteína usando el paquete de software EMBOSS (Rice, Longden et al. 2000). La secuenciación confirmó que aproximadamente el fragmento aislado de 492 bp representaba el TLRΔ64 y contenía la delección de 192 bp informada en comparación con el TLR3 del tipo salvaje (Yang et al., Yonesei Medical journal 45:359-361, 2004). El alineamiento de secuencias de proteínas del TLR3Δ64 y el TLR3 se muestra en la Figura 1.

45 **Ejemplo 2**

El TLR3Δ64 es deficiente en la señalización y modula la actividad del TLR3

50 Para evaluar las diferencias funcionales potenciales entre el TLR3 del tipo salvaje y el TLR3Δ64, se evaluó la capacidad del TLR3Δ64 de activar las vías de señalización corriente abajo. Se transfectaron transitoriamente células HEK293T con plásmidos que contenían TLR3 del tipo salvaje y/o ADNc de TLR3Δ64 en pcDNA3.1, se estimularon con poli(I:C) y se midió la inducción de NF-κB usando un ensayo de gen informador de luciferasa (Figura 2). El TLR3 del tipo salvaje demostró una inducción de 7,7 veces de la actividad de NF-κB dependiente del TLR3 inducida por poli(I:C), mientras que no hubo inducción de la activación de NF-κB dependiente del TLR3 cuando las células se transfectaron con el constructo de TLR3Δ64. La co- transfección de tanto el TLR3 del tipo salvaje como del TLR3Δ64 demostró un efecto negativo dominante para el TLR3Δ64. EL TLR3Δ64 suprimió la actividad del TLR3 del tipo salvaje en un 30%.

65 Se amplificó el ADN c de TLR3 humano de longitud completa (Genbank N° de Acceso U88879) a partir de células dendríticas humanas y se clonó en el pcDNA3.1. Usando los cebadores (Directo: 5' - CGA TCT TTC CTA CAA CAA CTT AAA TGT GTG GCT AAA ATG TTT GGA GCA CC - 3' (SEQ ID NO: 7) e Inverso: 5' - GGT GCT CCA AAC ATT TTA GCC ACA CAT TTA AGT TGT TGT AGG AAA GAT CG - 3' SEQ ID NO: 8) de IDT, Coralville, IA) y

5 pfu recombinante, se realizó la reacción de mutagénesis en el ADNc del TLR3 del tipo salvaje, se clonó en pcDNA3.1 DpnI (NEB, Ipswich, MA) se digirió y se transformó en *e. coli*. Se recogieron las colonias transformantes y se cultivaron durante la noche en cultivos que contenían ampicilina. Los plásmidos fueron después purificados y secuenciados (BigDye terminator v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA) para confirmar la presencia de la
 10 secuencia correcta correspondiente con el TLR3Δ64. Se sembraron células HEK293T en placas de 96 pocillos Costar blancas a una densidad de $4,2 \times 10^4$ células/pocillo en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de FBS. Después de 24 horas, las células se transfectaron con plásmidos que contenían el informador de luciferasa de luciérnaga pNifty-Luc (30 ng; Invivogen), informador de renilla phRL-TK (5 ng; Promega), y 0,6 ng/pocillo de plásmidos que contenían constructos de TLR3 o TLR3Δ64 usando el método de
 15 transfección de lipofectamina (Invitrogen) como se designa en la Figura 2. Veinticuatro horas después de la transfección, se aspiró el medio y se añadió DMEM con o sin poli(I:C) (1 μg/ml) a los conjuntos apropiados de células transfectadas para inducir la actividad de NF-κB dependiente del TLR3. Después de una incubación adicional durante 24 horas, las células se recogieron usando los reactivos del sistema de ensayo de luciferasa Dual Glo (Promega). Se cuantificó la luminiscencia usando El Lector de Placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Inc.) La secuencia de ADNc del TLR3 de longitud completa se muestra en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de ADNc del TLR3Δ64 se muestra en la SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 3

Tráfico Deficiente del TLRΔ64

20 Estudiamos la expresión de superficie, la localización subcelular y la estabilidad de proteínas del TLR3Δ64 para evaluar el mecanismo de supresión de la actividad del TLR3 del tipo salvaje por el TLR3Δ64. Se estudió la expresión de superficie del TLR3Δ64 y el TLR3 por análisis FACS de las proteínas sobreexpresadas en células
 25 HEK293T. Contrariamente al TLR3 del tipo salvaje localizado parcialmente en la superficie celular (Figura 3A), el TLR3Δ64 no se detectó en la superficie de células HEK293T (Figura 3B). Ambas proteínas, sin embargo, estaban presentes intracelularmente (Figura 3D, 3E). Se usó un mutante del TLR3 que carecía del dominio de señalización C-terminal (TLR3Δ64) requerido para la transducción de la señal de TLR3 y que mostró ser deficiente en inducir la activación de NF-κB como un control adicional en este experimento (Matsumoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 293:1364-1369, 2002). A pesar de la ausencia del dominio de señalización TIR y la incapacidad para activar la señalización corriente abajo, El TLR3ΔTIR se encontró tanto en la superficie como intracelularmente (Figura 3C, 3F). Por lo tanto, la falta de actividad no es predictiva de la localización correcta del TLR3.

35 La expresión de la membrana plasmática deficiente del TLR3Δ64 podría resultar de la estabilidad disminuida del TLR3Δ64. Con este fin, se compararon los niveles de estado estable de TLR3Δ64 y TLR3 de tipo salvaje después de 48 horas después de la transfección con el constructo correspondiente en células HEK293T por Western blot. EL TLR3Δ64 mostró estabilidad de estado estable comparable con la del TLR3 del tipo salvaje (datos no mostrados). Se usó actina como un control de carga en el experimento. Por lo tanto, la estabilidad reducida no es la causa de la carencia de la expresión de superficie del TLR3Δ64.

40 La localización subcelular del TLR3Δ64 y la posible co-localización con su poli(I:C) del sustrato se evaluó usando microscopía confocal. El TLR3 de tipo salvaje demostró fluorescencia citosólica recalcada que se co-localizó parcialmente con la fluorescencia del ligando poli(I:C) de TLR3. Además de la fluorescencia citosólica recalcada comparable con la del TLR3 del tipo salvaje, el TLR3ΔTIR demostró fluorescencia reticular difusa, y como con el
 45 TLR3 del tipo salvaje, superposición parcial con el ligando poli(I:C). La fluorescencia del TLR3Δ64 era distinta de la del TLR3 del tipo salvaje, demostrando tinción citosólica difusa reticular, habitualmente indicativa de la localización de ER. El TLR3Δ64 no se co-localizó con el poli(I:C) en las células. También se evaluaron la co-localización del TLR3Δ64 con un segundo ligando, ODN2006 y el ADNmc que se descubrió es un potente inhibidor de la señalización de TLR3 (Ranjith-Kumar et al., Mol. Cell. Biol. 28:4507-19, 2008). La microscopía confocal mostró que el TLR3Δ64 se retuvo en el compartimento intracelular reticular y falló en co-localizar con el ODN2006 vesicular mientras que dos controles, el TLR3 y el TLR3ΔTIR co-localizaron con el ODN2006. Por lo tanto, el TLR3Δ64 confirió defecto de translocación en el receptor que lo retenía en el compartimento intracelular reticular indicativo de ER, evitó su expresión de superficie, la translocación al compartimento endosómico y la co-localización con sus ligandos, en este ejemplo poli(I:C) y ODN2006, dos ligandos estructural y funcionalmente distintos, el primero siendo
 55 agonista del ARNdc, y el segundo un antagonista del ADNmc del TLR3.

60 Para el Western blot, se lisaron células HEK293T que expresaban del tipo salvaje o TLR3Δ64 recombinante en M-PER (Pierce Inc.) en presencia de inhibidores de proteasa mini completos (Roche Inc.) y se sonicaron para cortar el ADN cromosómico. Se separaron cantidades iguales de proteínas de cada muestra, como se determinó por un ensayo de proteínas BCA (Pierce Inc.), en gel Nu-PAGE 4-12% bis-tris y se transfirieron a una membrana de PVDF. El anticuerpo anti-TLR3 IMG-315A (Imgenex) se usó como un anticuerpo primario para el análisis Western. Las transferencias se desarrollaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa usando Sustrato de Máxima Sensibilidad SuperSignal West Femto (Pierce Inc.). Para el análisis confocal, se transfectaron transitoriamente células HEK293T como se ha descrito anteriormente. Después de una incubación de 24 horas se reemplazó el medio y las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm recubiertos con colágeno de cola de rata
 65

(BD Biosciences, San Diego, CA). Después de una incubación adicional de 12 horas, las células o se trataron con 2 μM de FITC ODN 2006 (InvivoGen) 3' modificado, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Poli(I-C) (Amershan) que fue etiquetado fluorescentemente usando un kit de etiquetado Cy5 como se recomienda por el fabricante (Mirus Bio Corp.), o se dejaron sin tratar durante 24 horas. Todas las células en los cubreobjetos fueron lavadas suavemente con PBS y transferidas a pocillos que contenían un 4% de paraformaldehído diluido en PBS y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 2 lavados en PBS que contenía 0,05% de Tween@20 [PBST], las células se permeabilizaron durante 15 minutos con 0,1% de TX-100 diluido en PBS, se lavaron una vez más, se bloquearon 30 minutos con potenciador de señal Image-iT@FX (Invitrogen), y se bloquearon adicionalmente 2 horas adicionales a temperatura ambiente con tampón de bloqueo 1X (Sigma). Las células permeabilizadas y fijadas se incubaron con un anticuerpo policlonal de TLR3 anti-humano de cabra (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) AF1487 (R&D Systems Inc.), se diluyeron en tampón de bloqueo durante la noche a 4° C, después se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti-cabra de burro conjugada Alexa Fluor@ 647 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Invitrogen) que contenía 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI (Sigma) diluido en tampón de bloqueo 1X. Los cubreobjetos fueron lavados cuidadosamente 4 veces adicionales en PBST seguido por un lavado en agua destilada, se invirtieron y se colocaron portaobjetos de microscopio que contenían medio de montaje Citifluor (Ted Pella) y se sellaron con esmalte de uñas. Se tomaron imágenes de las células usando un objetivo de inmersión en aceite 60X (NA=1.4) y se capturaron porciones ópticas de 0,2 μm usando un microscopio confocal UltraVIEW ERS (PerkinElmer). Para el análisis FACS, se transfectaron transitoriamente células HEK293T con plásmidos que contenían ADNc de TLR3 Δ 64 o TLR3 del tipo salvaje en pcDNA3.1 como se ha descrito. 24 horas después de la transfección, las células se lavaron en tampón de tinción en frío (SB) consistente de PBS + 3% FBS + 0,04% de NaN₃. La viabilidad por exclusión de azul de triptano fue de >95%. anti-TLR3 de cabra policlonal FITC-etiquetado (R&D FAB1487F) a 1 $\mu\text{g}/200.000$ células se incubó durante 30 minutos a 4° C. Antes de la tinción intracelular, las células se fijaron y permeabilizaron por incubación en tampón Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y el análisis se realizó usando FCS Express (De Novo Software, Ontario, Canada).

Ejemplo 4

EI TLR3 Δ 64 no interfiere con las regiones de enlace del ARN

Se mapearon los aminoácidos eliminados en el TLR3 Δ 64 en el dominio extracelular del TLR3 del tipo salvaje en el modelo basado en la estructura cristalina publicada de un complejo entre dos dominios extracelulares de TLR3 murinos y ARNdc para entender mejor las cuestiones estructurales y funcionales potenciales que pueden surgir como consecuencia de la delección (Liu et al., Science 320:379-381, 2008). En base al modelo, los aminoácidos 289-353 del TLR3 del tipo salvaje que se eliminan en el TLR3 Δ 64 no se encontró que coincidieran directamente con las regiones de enlace del ARN mapeadas. En su lugar, la pérdida de aminoácidos 289-353 se espera que acorte la región entre los dominios N- y C- terminales en cada TLR3-ECD que son responsables del enlace del ARNdc. Se ha demostrado anteriormente que la delección de algunos dominios, específicamente algunos dominios de repetición de LRR, entre las regiones de enlace de ARNdc N- y C- terminales suprimió la actividad del TLR3, presumiblemente perturbando las posiciones relativas de los dos sitios de enlace de ARNdc. Sin embargo, la delección de LRR11, abarcando aa 299 - 322 en el TLR3 de tipo salvaje y parcialmente superponiendo los aminoácidos 289 - 353 que se eliminan en el TLR3 Δ 64 no suprimieron la función del TLR3 (Takada et al, Mol. Immunol. 44:3633-3640, 2007). Por lo tanto, se mostró que los aminoácidos 289-353 de TLR3 controlan la translocación, la expresión de superficie y la co-localización del TLR3 con sus ligandos. Las funciones de estos aminoácidos no podrían predecirse en base al conocimiento previo de la estructura cristalina o la información de estudios de mutagénesis funcionales (Ranjith-Kumar et al., J. Biol. Chem. 282:7668-7678, 2007; Ranjith-Kumar et al., J. Biol. Chem. 282: 17696-17705, 2007; Sun et al., J. Biol. Chem. 281:11144-51, 2006; Takada et al, Mol. Immunol. 44:3633-3640, 2007).

Las coordenadas del TLR3 (PDB ID: 3CIY) se descargaron del banco de datos de proteínas. Se mapearon en el modelo los residuos 289-352 del TLR3 del tipo salvaje indicando la región ausente en el TLR3 Δ 64. Las imágenes gráficas moleculares se produjeron usando el paquete UCSF Chimera de Recurso de Biocomputación, Visualización e Informática en la University of California, San Francisco (apoyado por NIH P41 RR-01081).

Las realizaciones específicas descritas en la presente se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la invención se limitará por los términos de las reivindicaciones añadidas, junto con el ámbito completo de los equivalentes a los que dichas reivindicaciones tienen derecho, y la invención no estará limitada por las realizaciones específicas que se han presentado en la presente a modo de ejemplo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
 <120> METODOS PARA SUPRIMIR LA ACTIVIDAD DE RECEPTORES TIPO TOLL
 <130> CEN5236PCT

ES 2 550 264 T3

<140> PCT/US2009/059383
 <141> 2009-10-02

5 <150> 61/103033
 <151> 2008-10-02

<160> 10

10 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 817

15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

55

60

65

ES 2 550 264 T3

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

ES 2 550 264 T3

Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn Val Ser Val His Arg Val Leu Gly
 645 650 655
 Phe Lys Glu Ile Asp Arg Gln Thr Glu Gln Phe Glu Tyr Ala Ala Tyr
 660 665 670
 5 Ile Ile His Ala Tyr Lys Asp Lys Asp Trp Val Trp Glu His Phe Ser
 675 680 685
 Ser Met Glu Lys Glu Asp Gln Ser Leu Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg
 690 695 700
 10 Asp Phe Glu Ala Gly Val Phe Glu Leu Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile
 705 710 715 720
 Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe Val Ile Thr His His Leu Leu Lys
 725 730 735
 15 Asp Pro Leu Cys Lys Arg Phe Lys Val His His Ala Val Gln Gln Ala
 740 745 750
 Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile Leu Val Phe Leu Glu Glu Ile
 755 760 765
 20 Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala Leu Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe
 770 775 780
 Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp Pro Val Gln Lys Glu Arg Ile Gly
 785 790 795 800
 25 Ala Phe Arg His Lys Leu Gln Val Ala Leu Gly Ser Lys Asn Ser Val
 805 810 815
 His

<210> 2
 <211> 616
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

65

ES 2 550 264 T3

	Lys	Lys	Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Phe	Ser	Pro	Gly
				180					185					190		
5	Cys	Phe	His	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Phe	Gly	Leu	Phe	Leu	Asn	Asn	Val
			195					200					205			
	Gln	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Leu	Cys	Leu	Glu	Leu	Ala	Asn
		210					215					220				
10	Thr	Ser	Ile	Arg	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	Gln	Leu	Ser	Thr	Thr
	225				230						235					240
	Ser	Asn	Thr	Thr	Phe	Leu	Gly	Leu	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Thr	Met	Leu
					245					250					255	
	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Asn	Leu	Asn	Val	Trp	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	His
				260					265					270		
15	Leu	Asn	Met	Glu	Asp	Asn	Asp	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Ser	Asn	Met	Phe
			275					280					285			
	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	Phe	Thr
		290					295					300				
20	Ser	Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Asn	Glu	Thr	Phe	Val	Ser	Leu	Ala	His	Ser
	305					310					315					320
	Pro	Leu	His	Ile	Leu	Asn	Leu	Thr	Lys	Asn	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu
					325					330					335	
25	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Trp	Leu	Gly	His	Leu	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Gly
			340						345					350		
	Leu	Asn	Glu	Ile	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Glu	Trp	Arg	Gly	Leu
			355					360					365			
30	Glu	Asn	Ile	Phe	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gln	Leu
		370					375					380				
	Thr	Arg	Asn	Ser	Phe	Ala	Leu	Val	Pro	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Met	Leu
	385					390					395					400
	Arg	Arg	Val	Ala	Leu	Lys	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Phe	Gln
				405					410						415	
35	Pro	Leu	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Ile	Ala
				420					425					430		
	Asn	Ile	Asn	Asp	Asp	Met	Leu	Glu	Gly	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Ile	Leu
			435					440					445			
40	Asp	Leu	Gln	His	Asn	Asn	Leu	Ala	Arg	Leu	Trp	Lys	His	Ala	Asn	Pro
		450				455						460				
	Gly	Gly	Pro	Ile	Tyr	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Ser	His	Leu	His	Ile	Leu
	465					470					475					480
45	Asn	Leu	Glu	Ser	Asn	Gly	Phe	Asp	Glu	Ile	Pro	Val	Glu	Val	Phe	Lys
				485					490						495	
	Asp	Leu	Phe	Glu	Leu	Lys	Ile	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Asn
			500						505					510		
50	Thr	Leu	Pro	Ala	Ser	Val	Phe	Asn	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu
		515						520					525			
	Asn	Leu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Val	Phe	Gly
		530					535					540				
55	Pro	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Asp	Met	Arg	Phe	Asn	Pro	Phe
	545					550					555					560
	Asp	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Ile	Ala	Trp	Phe	Val	Asn	Trp	Ile	Asn	Glu
				565						570					575	
60	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Glu	Leu	Ser	Ser	His	Tyr	Leu	Cys	Asn	Thr
				580					585					590		
	Pro	Pro	His	Tyr	His	Gly	Phe	Pro	Val	Arg	Leu	Phe	Asp	Thr	Ser	Ser
			595					600					605			
65						Cys	Lys	Asp	Ser	Ala	Pro	Phe	Glu			
						610							615			

ES 2 550 264 T3

<210> 3
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

	Val	Gly	Asn	Asp	Ser	Phe	Ala	Trp	Leu	Pro	Gln	Leu	Glu	Tyr	Phe	Phe
	1				5					10					15	
10	Leu	Glu	Tyr	Asn	Asn	Ile	Gln	His	Leu	Phe	Ser	His	Ser	Leu	His	Gly
				20					25					30		
	Leu	Phe	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Asn	Leu	Lys	Arg	Ser	Phe	Thr	Lys	Gln
			35					40					45			
15	Ser	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Ile	Asp	Asp	Phe	Ser	Phe	Gln
		50					55					60				

<210> 4
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 4

25	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		
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				
35	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	
40	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			
45	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
50	Ser	Thr	Lys	Leu	Gly	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Glu	Leu
				165						170					175	
	Leu	Leu	Ser	Asn	Asn	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Lys	Ser	Glu	Glu	Leu	Asp
				180					185					190		
55	Ile	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Asn	Gln
			195					200						205		

60

65

ES 2 550 264 T3

	Ile	Lys	Glu	Phe	Ser	Pro	Gly	Cys	Phe	His	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Phe
		210					215					220				
5	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		
10	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				
15	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	
20	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			
25	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	
30	Asn	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Trp	Leu	Gly	His
				420					425					430		
	Leu	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Ile	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr
			435					440					445			
35	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
40	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		
45	Leu	Ser	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				
50	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		
55	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				
60	Val	Glu	Lys	Lys	Val	Phe	Gly	Pro	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu
	625					630					635					640

65

ES 2 550 264 T3

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

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador usado para amplificar TLR64

 50 <400> 5
 gatctgtctc ataatggctt gtca 24

 <210> 6
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador usado para amplificar TLR64

 60 <400> 6
 gttatcaat cctgtgaaca tat 23

 <210> 7
 65 <211> 50

ES 2 550 264 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Cebador usado para la mutagénesis in vitro para generar TLR3?64

<400> 7
cgatcttcc tacaacaact taaatgtgtg gctaaaatgt ttggagcacc 50

10 <210> 8
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador usado para la mutagénesis in vitro para generar TLR3?64

<400> 8
ggtgctccaa acattttagc cacacattta agttgttga ggaaagatcg 50

20 <210> 9
<211> 2715
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 9

atgagacaga ctttgcccttg tatctacttt tggggggggcc ttttgcctt tgggatgctg 60
tgtgcatcct ccaccaccaa gtgcactggt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120
30 aagttgactc aggtaccoga tgatctaacc acaaacataa cagtgttgaa ccttaccat 180
aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240
gatgtaggat ttaacacat ctcaaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300
ttaaagttt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360
35 ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaat 420
aatccctttg tcaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggcttgtca 480
tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
aataaaattc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct ttgccaatc atcttataaa 600
aaattagagt tgtcatcgaa tcaaattaaa gagttttctc caggggtggtt tcacgcaatt 660
40 ggaagattat ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
ctatgtttg aattagcaaa cacaagcatt cggaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaagtga caaatctcac tatgctcgat 840
ctttcctaca acaacttaaa tgtggttggg aacgattcct ttgcttggct tccacaacta 900
45 gaatatttct tcctagagta taataatata cagcatttgt tttctcactc tttgcacggg 960
cttttcaatg tgaggtaact gaatttgaaa cggcttttta ctaaacaag tatttcctt 1020
gcctcactcc ccaagattga tgatttttct tttcagtggc taaaatggtt ggagcacctt 1080
aacatggaag ataatgatat tccaggcata aaaagcaata tgttcacag attgataaac 1140
ctgaaatact taagtctatc caactcctt acaagtttgc gaactttgac aaatgaaaca 1200

50

55

60

65

ES 2 550 264 T3

5 tttgtatcac ttgctcattc tcccttacac ataactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
 aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg ggccacctag aagtacttga cctgggcctt 1320
 aatgaaattg ggcaagaact cacaggccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380
 atctatcttt cctacaacaa gtacctgcag ctgactagga actcctttgc ctgggtccca 1440
 agccttcaac gactgatgct ccgaagggtg gcccttaaaa atgtggatag ctctccttca 1500
 ccattccagc ctcttctgtaa cttgaccatt ctggatctaa gcaacaacaa catagccaac 1560
 ataaatgatg acatgttgga gggctcttgag aaactagaaa ttctcgattt gcagcataac 1620
 10 aacttagcac ggctctggaa acacgcaaac cctggtggtc ccattttattt cctaaaggggt 1680
 ctgtctcacc tccacatcct taacttggag tccaacggct ttgacgagat cccagttgag 1740
 gtcttcaagg atttatttga actaaagatc atcgatttag gattgaataa tttaaacaca 1800
 cttccagcat ctgtctttta taatcaggtg tctctaaagt cattgaacct tcagaagaat 1860
 ctcataacat ccgttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaggaacct gactgagtta 1920
 15 gatatgagct ttaatccttt tgattgcacg tgtgaaagta ttgcctgggt tgtaattgg 1980
 ataacgaga cccataccaa catccttgag ctgtcaagcc actacctttg caacactcca 2040
 cctoactatc atggggtccc agtgagactt tttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100
 ccctttgaac tctttttcat gatcaatacc agtatcctgt tgatttttat ctttattgta 2160
 20 cttctcatcc actttgaggg ctggaggata tctttttatt ggaatgtttc agtacatcga 2220
 gttcttggtt tcaaagaaat agacagacag acagaacagt ttgaatatgc agcatatata 2280
 attcatgcct ataaagataa ggattgggtc tgggaacatt tctcttcaat ggaaaaggaa 2340
 gaccaatctc tcaaattttg tctggaagaa agggactttg aggcgggtgt tttgaaacta 2400
 25 gaagcaattg ttaacagcat caaaagaagc agaaaaatta tttttggtat aacacacat 2460
 ctattaaaag acccattatg caaaagattc aaggtagatc atgcagttca acaagctatt 2520
 gaacaaaatc tggattccat tatattgggt ttccttgagg agattccaga ttataaactg 2580
 aaccatgcac tctgttttgcg aagaggaatg tttaaatctc actgcatctt gaactggcca 2640
 gttcagaaag aacggatagg tgcctttcgt cataaattgc aagtagcact tggatccaaa 2700
 30 aactctgtac attaa 2715

<210> 10
 <211> 2523
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 10

40 atgagacaga ctttgccttg tatctacttt tggggggggcc ttttgcctt tgggatgctg 60
 tgtgcatoct ccaccaccaa gtgactgtt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120
 aagttgactc aggtaccgga tgatctacc acaaacataa cagtgttgaa ccttaccat 180
 aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240
 gatgtaggat ttaacacat ctcaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300
 45 ttaaagttt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360
 ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaaat 420
 aatccctttg tcaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggcttgtca 480
 tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
 aataaaatc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct ttgccaattc atctttaaaa 600
 50 aaattagagt tgtcatcgaa tcaaattaaa gagttttctc cagggtgttt tcacgcaatt 660
 ggaagattat ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
 ctatgttttg aattagcaaa cacaagcatt cggaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
 tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaagtgga caaatctcac tatgctcgat 840
 ctttcctaca acaacttaaa tgtgtggcta aaatgtttgg agcacotaa catggaagat 900
 55 aatgatattc caggcataaa aagcaatatg ttcacaggat tgataaacct gaaataacta 960
 agtctatcca actcctttac aagtttgca actttgacaa atgaaacatt tgtatcactt 1020
 gctcattctc ccttacacat actcaaccta accaagaata aaatctcaa aatagagagt 1080
 gatgctttct cttggttggg ccacctagaa gtacttgacc tgggccttaa tgaaattggg 1140
 60 caagaactca caggccagga atggagaggt ctagaaaata ttttcgaaat ctatctttcc 1200
 tacaacaagt acctgcagct gactaggaac tcttttgcct tgggtcccaag ccttcaacga 1260

65

ES 2 550 264 T3

ctgatgctcc gaaggggtggc ccttaaaaaat gtggatagct ctccttcacc attccagcct 1320
 cttcgtaact tgaccattct ggatctaagc aacaacaaca tagccaacat aaatgatgac 1380
 atgttggagg gtcttgagaa actagaaatt ctcgatttgc agcataaaca cttagcacgg 1440
 ctctggaaac acgcaaacc tggtggtccc atttatttcc taaaggtct gtctcacctc 1500
 5 cacatcctta acttgagtc caacggcttt gacgagatcc cagttgaggt cttcaaggat 1560
 ttatttgaac taaagatcat cgatttagga ttgaataatt taaacacact tccagcatct 1620
 gtctttaata atcaggtgtc tctaaagtca ttgaaccttc agaagaatct cataacatcc 1680
 gttgagaaga aggttttcgg gccagctttc aggaacctga ctgagttaga tatgcgcttt 1740
 10 aatccctttg attgcacgtg tgaaagtatt gcctggtttg ttaattggat taacgagacc 1800
 cataccaaca tccctgagct gtcaagccac tacctttgca aactccacc tcaatcat 1860
 gggttcccag tgagactttt tgatacatca tcttgcaaag acagtgcccc ctttgaactc 1920
 tttttcatga tcaataccag tatcctggtg atttttatct ttattgtact tctcatccac 1980
 tttgagggtc ggaggatata tttttattgg aatgtttcag tacatcgagt tcttggtttc 2040
 15 aaagaaatag acagacagac agaacagttt gaatatgcag catatataat tcatgcctat 2100
 aaagataagg attgggtctg ggaacatttc tcttcaatgg aaaaggaaga ccaatctctc 2160
 aaattttctc tggaagaaag ggactttgag gcgggtgttt ttgaactaga agcaattggt 2220
 aacagcatca aaagaagcag aaaaattatt tttgttataa cacaccatct attaaaagac 2280
 20 ccattatgca aaagattcaa ggtacatcat gcagttcaac aagctattga acaaaatctg 2340
 gattcatta tattggtttt ccttgaggag attccagatt ataaactgaa ccatgcactc 2400
 tgtttgcgaa gaggaatgtt taaatctcac tgcacttga actggccagt tcagaaagaa 2460
 cggataggtg cttttcgtca taaattgcaa gtagcacttg gatccaaaaa ctctgtacat 2520
 taa 2523
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agente que interfiere con la translocación del receptor tipo Toll 3 (TLR3), para su uso en la supresión de la actividad del TLR3 en un sujeto con necesidad de lo mismo, en el que el agente es una variante del TLR3 que no comprende los residuos de aminoácidos 289-352 del dominio extracelular del TLR3 del tipo salvaje representado por la SEQ ID NO: 4
- 10 **2.** Un agente que interfiere con la translocación del receptor tipo Toll (TLR3), para su uso en la supresión de la actividad del TLR3 con necesidad de los mismos, en el que el agente es una variante del TLR3, y en el que la variante del TLR3 comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 15 **3.** El agente para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:
- 15 a) el sujeto es un humano; o
b) el agente se conjuga con un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, supercóntigo alternativo o proteína.
- 20 **4.** El agente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende además administrar el agente en combinación con un segundo modulador de la actividad del TLR3.
- 5.** El agente para el uso según la reivindicación 4, en el que el segundo modulador es un anticuerpo, oligonucleótido, o antagonista de molécula pequeña del TLR3.
- 25 **6.** El agente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente interfiere con:
- 30 a) la expresión de superficie del TLR3
b) la translocación del TLR3 del retículo endoplasmático;
c) la translocación del TLR3 al endosoma; o
d) la co-localización del TLR3 con su ligando.
- 7.** El agente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en tratar o prevenir
- 35 a) una condición inflamatoria;
b) una condición necrótica;
c) una enfermedad infecciosa;
d) una enfermedad cardiovascular;
e) diabetes tipo I o tipo II;
40 f) un cáncer;
g) una enfermedad reumatoide;
h) una enfermedad pulmonar; o
i) un trastorno neurológico.
en el que el agente se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente con necesidad del mismo, durante un tiempo suficiente para tratar o prevenir la condición o enfermedad.
- 45 **8.** El agente para el uso según la reivindicación 7 en el que la condición inflamatoria es:
- 50 a) asociada a infecciones; o
b) pancreatitis, alopecia areata, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, enfermedad de Bechet, cirrosis, fibrosis hepática, enfermedad de Crohn, enteritis regional, vitiligo inflamatorio, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, cirrosis biliar primaria, psoriasis, esclerodermia, colangitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, necrólisis epidérmica tóxica, colitis ulcerosa, verrugas, cicatrices hipertróficas, queloides o lesión inducida por acetaminofeno.
- 55 **9.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que la condición necrótica es fallo renal agudo.
- 10.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad infecciosa es ántrax, infección por C. difficile, encefalitis/meningitis, endocarditis, hepatitis C, síndrome respiratorio agudo de la gripe/severo (SARS), neumonía, sepsis, condiciones de la piel relacionadas con quemaduras o traumas o el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).
- 60 **11.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, infarto de miocardio o apoplejía.
- 65 **12.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer es leucemia aguda, cáncer de mama,

leucemia crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, enfermedad de Hodgkin, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, mieloma múltiple, enfermedad no de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de células renales, cánceres de cabeza y cuello o cánceres inducidos por virus.

5 **13.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad reumatoide es tiroiditis autoinmune, vasculitis autoinmune, lupus eritematoso discoide, nefritis lúpica, osteoartritis, policondritis, polimialgia reumática, artritis psoriásica, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o esclerodermia sistémica.

10 **14.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad pulmonar es lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, exacerbaciones de asma aguda, exacerbaciones agudas de la EPOC, fibrosis pulmonar idiopática o sarcoidosis.

15 **15.** El agente para el uso según la reivindicación 7, en el que el trastorno neurológico es apoplejía, enfermedad de Alzheimer, meningitis, lesión de la médula espinal, trauma, trastornos de desmielinización o dolor.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Hu_TLR3	101	LKVLNLQHNELSQLSDKTFAFCTNLTELHLMSNSIQKIKNNPFVKQKNI	150	
Hu_TLR3_Iso	101	LKVLNLQHNELSQLSDKTFAFCTNLTELHLMSNSIQKIKNNPFVKQKNI	150	
Hu_TLR3	151	TLDLSHNGLSSTKLGTVQVLENLQELLSSNNKIQAALKSEELDI FANSSLK	200	} Región Amplificada por PCR
Hu_TLR3_Iso	151	TLDLSHNGLSSTKLGTVQVLENLQELLSSNNKIQAALKSEELDI FANSSLK	200	
Hu_TLR3	201	KLELSSNQIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNNVQLGPSLTEKLCLELANTSI	250	
Hu_TLR3_Iso	201	KLELSSNQIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNNVQLGPSLTEKLCLELANTSI	250	
Hu_TLR3	251	RNLSLSNSQLSTTSNTTFLGLKWTNLTMLDLSYNNLN VGNDS FAWLPQL	300	
Hu_TLR3_Iso	251	RNLSLSNSQLSTTSNTTFLGLKWTNLTMLDLSYNNLN V-----	288	
Hu_TLR3	301	EYFFLEYNNIQHLFSHSLHGLFNVRYNLKRSTFKQSI SLASLPKIDDFS	350	
Hu_TLR3_Iso	288	-----	288	
Hu_TLR3	351	FQWLKCLEHLNMDNDIPGIKSNMFTGLINLKYLSLSNSFTSLRRLTNET	400	
Hu_TLR3_Iso	289	--WLKCLEHLNMDNDIPGIKSNMFTGLINLKYLSLSNSFTSLRRLTNET	336	
Hu_TLR3	401	FVSLAHSPLHILNLTKNKISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLNEIGQELTGQ	450	
Hu_TLR3_Iso	337	FVSLAHSPLHILNLTKNKISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLNEIGQELTGQ	386	

Figura 2

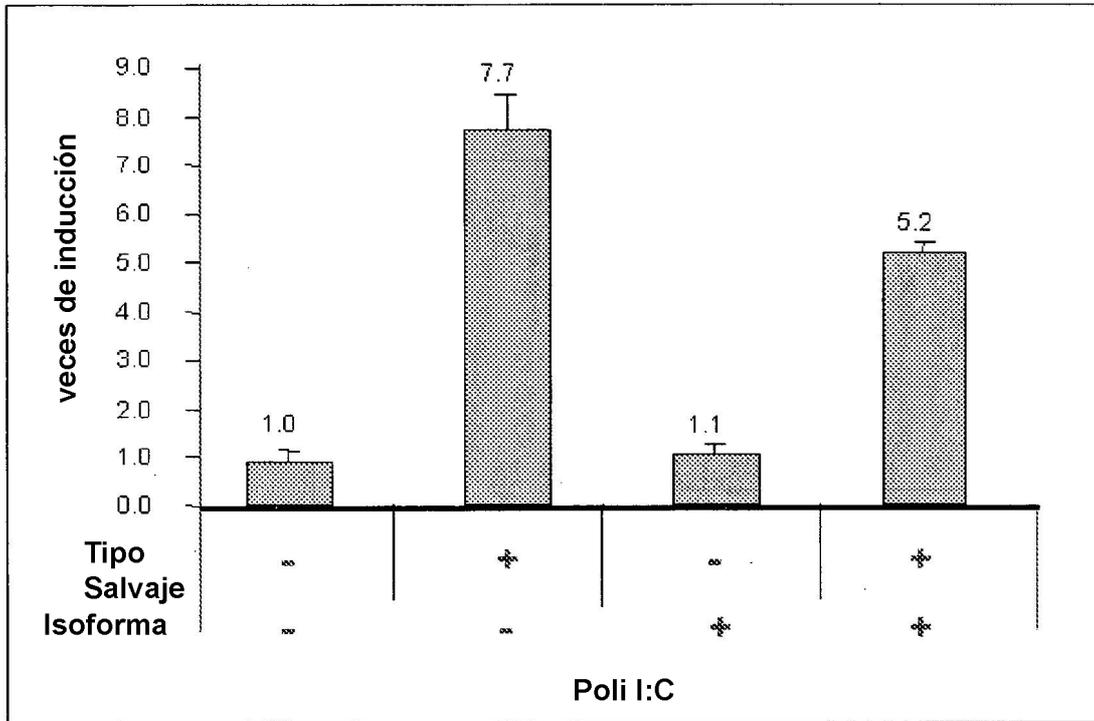


Figura 3

